

00524
112



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

"COMPARACION DE TECNICAS ANALITICAS EN LA
EVALUACION DE LIMPIEZA DE LOS EQUIPOS
UTILIZADOS EN LA FABRICACION DE TABLETAS DE
LIOTIRONINA".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
LUZ MYRIAM MIRANDA MONDRAGON



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2003

1



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

autoriza a la Dirección General de Bibliotecas -
JNAM a difundir en formato electrónico e impres-
sionado el contenido de mi trabajo recepcionado
NOMBRE: Luz Myriam Miranda
Mondragón
FECHA: 17 JUL 103
FIRMA: [Firma]

JURADO ASIGNADO.

Presidente	Prof. Alfredo Garzón Serra
Vocal	Prof. Georgina Margarita Maya Ruiz
Secretario	Prof. Honoría Fuentes Sixtos
Primer Suplente	Prof. Juan Manuel Rodríguez
Segundo Suplente	Prof. María de Lourdes Cervantes Ayala

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Nysco de México S.A. de C.V. Calzada Ermita Iztapalapa No. 436-B
Tel 56979551 Col. Mexicaltzingo, Iztapalapa, C. P. 09080**

Asesor de Tesis

[Firma]
QFB Alfredo Garzón Serra

Supervisor Técnico

[Firma]
IBQ José Eduardo Castillo Chaires

Sustentante

[Firma]
Luz Myriam Miranda Mondragón

*Doy gracias a Dios
por darme la dicha de concluir
esta etapa de mi vida en compañía de:*

*Mis padres: Abel Miranda y María de la Luz Mondragón
A quienes agradezco su apoyo y confianza.*

*A mis hermanos: Korina, Xóchitl, Abel, Danac, Ariadna,
Aarón, Artemisa y Carlos, por su esencia que cada uno lleva
en su interior y por su apoyo recibido.*

*A esta familia: padres y hermanos
por todo lo que hemos aprendido juntos:
por las alegrías, las tristezas,
los triunfos y derrotas vividas.*

*Agradezco a la
Universidad Nacional Autónoma de México
por permitirme realizar mis estudios de licenciatura
en sus instalaciones.*

*A la Facultad de Química
por su gran diversidad de personas e ideas que en conjunto
con su personal docente
me ha permitido concluir esta etapa.*

*A Erika, Ricardo, Alberto, Mayra, David,
Nadia, Adriana y Eleoneth por su apoyo y confianza.
Así como a todas las personas con las que compartí mi estancia
en la Facultad de Química.*

A

*Al profr. Alfredo Garzón Serra
le agradezco la oportunidad de permitirme realizar
mi tesis en el laboratorio
Nysco de México S.A. de C.V.
y ver realizada una de mis más grandes metas.*

*Finalmente agradezco las enseñanzas y paciencia
que tuvieron para conmigo J. Eduardo Castillo, Blanca Lilia V. y
Ma. Luisa E., así como a todos los integrantes
del departamento Analítico de
Nysco de México.*

México, Pumas, Universidad

**Comparación de técnicas analíticas
en la evaluación de limpieza de
los equipos utilizados en la
fabricación de tabletas de
liotironina.**

ÍNDICE

	pág
Introducción	1
Objetivos	3
1. Generalidades	4
Validación de Métodos Analíticos	15
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	18
Espectroscopía de Infrarrojo	28
Determinación de Carbono Orgánico Total	39
Validación de Limpieza y Criterios de Aceptación	43
2. Desarrollo Experimental y Resultados	
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	47
Espectroscopía de Infrarrojo	67
Carbono Orgánico Total	71
3. Análisis de Resultados	84
Conclusiones	86
Anexo I	87
Bibliografía	88

ÍNDICE DE GRÁFICAS Y FIGURAS.

Gráfica 1. Espectro en luz ultravioleta de liotironina sódica	pág 5
Gráfica 2. Espectro de infrarrojo de liotironina sódica	5
Figura 1. Diagrama de bloques de un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución	18
Figura 2. Esquema de elemento unitario de una bomba	19
Figura 3. "Loop" de inyección	20
Figura 4. Espectro de radiación electromagnética	29
Figura 5. Movimientos vibracionales de una molécula	31
Figura 6. Interferómetro de Michelson	32
Figura 7. Esquema del accesorio de ATR	38
Figura 8. Principio del accesorio de ATR	38
Figura 9. Analizador de carbono orgánico total	40

INTRODUCCIÓN

La limpieza correcta de los equipos de fabricación es de suma importancia en la industria farmacéutica, ya que es necesario prevenir, principalmente la contaminación cruzada entre diferentes productos, proporcionando de esta forma medicamentos de calidad a médicos y pacientes.

Ante esto, en el año de 1993 , inspecciones de la FDA (Food and Drug Administration) a la industria, revelaron la necesidad de contar con un método sistemático para probar la efectividad de los procedimientos de limpieza elaborando una guía de inspección de validación de limpieza.

La validación de limpieza es un proceso para asegurar que el procedimiento de limpieza empleado en un equipo de fabricación elimina residuos a niveles previamente establecidos como aceptables, que no alteran la calidad del siguiente producto a fabricar, protegiendo la salud de quien use los medicamentos.

Un programa de validación de limpieza completo incluye la identificación de los elementos de validación, el alcance de la prueba, el establecimiento de los límites aceptables, el desarrollo de procedimientos de muestreo y análisis de las muestras, así como el diseño de un proceso de validación de limpieza y un método de análisis de datos.

Así como es importante que los equipos de fabricación se encuentren limpios, también es importante contar con un buen método de muestreo y con un método analítico adecuado. Es decir un método que permita cuantificar con exactitud al menos las cantidades que corresponden a los límites aceptables.

En el presente proyecto se hace énfasis en el procedimiento de muestreo y el desarrollo del procedimiento de prueba, en donde se establece un método que permita cuantificar trazas de liotironina como contaminante en los equipos donde se fabrican tabletas con este fármaco después de ser sometidos a un procedimiento de limpieza.

Para ello se desarrollarán métodos analíticos empleando por un lado cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y por otro espectroscopía de infrarrojo (I.R.) o por carbono orgánico total (TOC) , de tal forma que se determine cual es la técnica que conviene utilizar.

Una vez desarrollados los métodos analíticos, se procederá a realizar la validación, generando con ello evidencia documental de que el método funciona para verificar la eficiencia del procedimiento de limpieza de los equipos de fabricación.

OBJETIVOS

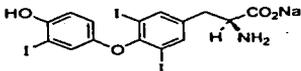
- Desarrollar y validar métodos analíticos que nos permitan evaluar la limpieza de los equipos utilizados en la fabricación de tabletas con liotironina, empleando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y espectroscopía de infrarrojo (IR) o análisis de carbono orgánico total (TOC).
- Determinar cual es la técnica que conviene utilizar para evaluar la limpieza de los equipos utilizados en la fabricación de tabletas de liotironina.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

Liotironina sódica ¹

Estructura química:



Fórmula condensada: $C_{15}H_{11}I_3NNaO_4$

Masa molecular: 672.96 g/mol

Nombre químico: Sal de sodio de o-(4-hidroxi-3-yodofenil)-3,5-diyodo-L-tirosina.

Sinónimos: L-triyodotironina de sodio; T3 tironina de sodio²; 3,5,3'-Triyodo-L-tironina de sodio.

Descripción: Polvo cristalino de color marrón.

Solubilidad: Muy ligeramente soluble en agua; ligeramente soluble en etanol; casi insoluble en la mayoría de los disolventes orgánicos. Soluble en soluciones diluidas de hidróxidos alcalinos.³

Pérdida por secado. No más del 4.0 por ciento de su peso.

Rotación específica. Entre +18° y +22°.

Cloruros. No más del 1.2 por ciento

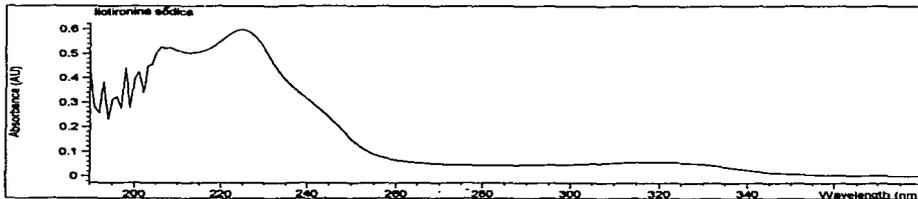
Sodio. Entre 2.9 y 4.0 por ciento.

Yoduro inorgánico. No más del 0.08 por ciento.

Ensayos de identidad:

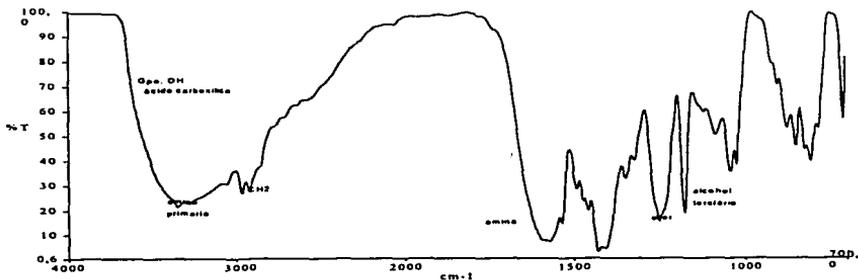
- Espectro en luz U.V:

Una solución de 8 µg/mL de liotironina en solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico presenta un máximo a 230 nm.



- Espectro de IR :

El espectro de IR se obtiene por la técnica de la pastilla de bromuro de potasio. Pulverizar en un mortero de ágata de 1.0 mg a 3.0 mg de liotironina. Agregar de 300 mg a 400 mg de bromuro de potasio (previamente seco), homogeneizar y preparar la pastilla.



Valoración.

Fase móvil. Preparar una mezcla desgasificada y filtrada, de agua y acetonitrilo (65:35), que contenga 1 mL de ácido fosfórico en cada 1000 mL de solución.

Solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico. En 500 mL de agua disolver 400 mg de hidróxido de sodio; enfriar, agregar 500 mL de metanol y mezclar.

Preparación de referencia. En solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico, disolver una porción calculada de la sustancia de referencia, para obtener una solución que contenga una concentración conocida de aproximadamente 8 µg/mL. Preparar por duplicado.

Preparación de solución problema. Realizar el raspado de superficie con 2 hisopos previamente humedecidos con 150 µL de solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico en un área equivalente a 50 cm² en el equipo a muestrear. Colocar los hisopos en un vial y cortar la cabeza de estos, adicionar 15.0 mL de solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico para extraer la muestra y agitar durante dos minutos en vortex. Filtrar por acrodisco Gelman GHP de 22 mm, 0.45 µm de tamaño de poro.

Condiciones del equipo. El cromatógrafo de líquidos debe estar equipado con un detector para 230 nm y una columna de 4.6 mm y 250 mm conteniendo empaque ODS de 5 µm de tamaño de partícula. La velocidad de flujo es de 1.2 mL/min y el volumen de inyección de 20 µL.

Cálculos.

Calcular la cantidad de liotironina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{g liotironina}}{\text{muestreo}} = \frac{\text{Amtra} \times \text{Pstd} \times \text{FVstd} \times 4.0 \times 651.0 \times 15.0 \times 1000}{\text{Astd} \times 100 \times 50 \times 673.0}$$

Donde:

- Amtra = Área de la solución muestra
- Astd = Área promedio de la solución patrón de referencia
- Pstd = Peso promedio de la sustancia de referencia (mg)
- FVstd = Factor de valoración de la sustancia de referencia (%/100)
- 651.0 = Masa molecular de liotironina

673.0 = Masa molecular de liotironina sódica
15.0 = Volumen de extracción de la muestra
100 y 50= Aforos de la solución de referencia
4.0 = Alícuota de la solución de referencia
1000 = Factor de conversión de μg a mg

Conservación. Mantener en envases cerrados, protegidos de la luz.

La triyodotironina* en conjunto con la tiroxina (T4) son las principales hormonas tiroideas, las cuales son aminoácidos que contienen yodo, y son derivados de la tirosina. La triyodotironina es cualitativamente similar a la tiroxina en su efecto biológico, pero es mucho más potente⁵. Además solo difieren en un átomo de yodo.

SÍNTESIS DE HORMONAS TIROIDAS⁴

Las hormonas tiroideas se sintetizan y almacenan como residuos de aminoácidos de tiroglobulina, proteína que constituye la mayor parte del coloide folicular de la tiroides.

Los principales pasos en la síntesis, almacenamiento, liberación e interconversión de hormonas tiroideas son :

1. Captación del ión yoduro por la glándula tiroides. El yodo ingerido durante la dieta alcanza la circulación en forma de yoduro. La concentración sanguínea es muy baja (0.2-0.4 $\mu\text{g}/\text{dL}$), pero la glándula tiroidea transporta con eficacia y de manera activa el ión. El mecanismo de transporte de yoduro queda inhibido por diversos iones como el tiocianato y el perclorato. El sistema de transporte es estimulado por la tirotrópina y controlado también por un mecanismo autorregulador. De este modo, las reservas disminuidas de yodo tiroideo aumentan la captación de yoduro, y la administración de este último puede revertir esta situación.

* Nota. Queda entendido que la triyodotironina y la liotironina se refiere a la misma entidad química. Triyodotironina como la hormona tiroidea natural y la liotironina como preparación sintética.

2. Oxidación del yoduro y yodación de grupos tirosil de la tiroglobulina. Para llevarse a cabo la yodación de los residuos de tirosina se necesita que las especies yodantes se encuentren en un estado más alto de oxidación que el anión, tales como el ácido hipoyodoso (HOI) o como una especie ligada a enzimas.

La oxidación del yoduro hacia su forma activa se logra mediante la peroxidasa tiroidea, enzima que contiene un grupo hem, que utiliza peróxido de hidrógeno como oxidante.

La peroxidasa está unida a la membrana y parece estar concentrada en la membrana apical de la célula tiroidea o cerca de la misma. Da como resultado la formación de residuos de monoyodotirosil y diyodotirosil en la tiroglobulina, las cuales permanecen unidas a la célula por uniones peptídicas.

3. Formación de tiroxina y triyodotironina a partir de yodotirosinas. El paso restante es el acoplamiento de dos residuos diyodotirosil para formar tiroxina, o de residuos monoyodotirosil y diyodotirosil para constituir triyodotironina. Las reacciones anteriores son oxidativas y parecen estar catalizadas por la peroxidasa antes mencionada.

El mecanismo comprende la transferencia enzimática de grupos, quizá como radicales libres yodotirosil o iones con carga positiva, dentro de la tiroglobulina. La tiroglobulina de esta forma es muy eficaz para generar tiroxina. La tiroxina se forma de manera primaria cerca del amino terminal de la proteína, en tanto que la triyodotironina se sintetiza cerca del carboxilo terminal. Las tasas relativas de actividad sintética en los diversos sitios depende de la concentración de hormona estimulante de la tiroidea y de la disponibilidad de yoduro. Aún cuando un decremento en la disponibilidad de yoduro y el aumento relacionado de la proporción de monoyodotirosina favorecen la formación de triyodotironina sobre tiroxina, una deficiencia de diyodotirosina puede alterar la síntesis de ambas formas de la hormona.

4. Proteólisis de tiroglobulina y liberación de tiroxina y triyodotironina hacia la sangre. Para liberarse ambas hormonas de la tiroglobulina debe haber una proteólisis.

La hormona estimulante de la tiroides para aumentar la desintegración de la tiroglobulina incrementa la actividad de varias tiol endopeptidasas de las lisosomas. Las endopeptidasas desdoblan de manera selectiva a la tiroglobulina, lo cual origina intermediarios que contienen hormona, los cuales después son procesados por exopeptidasas y posteriormente las hormonas liberadas salen de la célula.

5. Conversión de tiroxina en triyodotironina en tejidos periféricos. En situaciones normales, alrededor del 41% de la tiroxina se convierte en triyodotironina gracias a la pérdida de yodo de la tiroxina, reacción catalizada por la yodotironina 5-desyodasa que se encuentra en los tejidos periféricos. Por esta razón se considera a la tiroxina como prohormona.

Hiperfunción tiroidea ⁴ La tirotoxicosis es un padecimiento causado por cifras altas de hormonas tiroideas libres circulantes. Varios trastornos de diferentes causas pueden originar este síndrome. El término hipertiroidismo es restringido a padecimientos en el cual hay una liberación excesiva de hormonas debido a la hiperfunción de la glándula.

Hipofunción tiroidea ⁴ El hipotiroidismo, conocido como mixema cuando es grave, es el trastorno más frecuente de la función tiroidea. La poca funcionalidad de la glándula tiroidea es la causa más común de hipotiroidismo, y se denomina hipotiroidismo primario. El hipotiroidismo presente al nacimiento se conoce como hipotiroidismo congénito, y es la causa prevenible más habitual de retraso mental en el mundo.

FARMACODINAMIA ^{4,5}

Acción de las hormonas tiroideas. Los mecanismos bioquímicos precisos a través de los cuales las hormonas tiroideas ejercen sus acciones vinculadas con el desarrollo, y las específicas para los tejidos, se han comenzado a entender. La mayor parte de los efectos de las hormonas tiroideas son mediados por receptores nucleares. La triyodotironina se une a receptores nucleares de alta afinidad, que a continuación

se unen a una secuencia de DNA específica en la región promotora/reguladora de genes específicos. La triyodotironina regula la transcripción de genes y la síntesis de proteínas. Los receptores relacionados con la hormona también pueden tener efectos de activación o represivos directos. A continuación se mencionan algunas de las funciones mediadas por hormonas tiroideas.

Los efectos de las hormonas tiroideas sobre la síntesis de proteínas y la actividad enzimática influyen sobre muchos tejidos.

Crecimiento y desarrollo. La hormona tiroidea es crítica en el desarrollo cerebral. La aparición de receptores funcionales, unidos a cromatina, para la hormona tiroidea, coincide con la neurogénesis en el cerebro. La falta de hormona tiroidea durante el período de neurogénesis activa conduce a retraso mental irreversible (cretinismo) y se acompaña de múltiples alteraciones morfológicas en el cerebro. Esos trastornos morfológicos graves dependen de anomalías de la emigración neuronal. Los complementos de hormona tiroidea durante las primeras dos semanas de vida evitan la aparición de esos cambios morfológicos alterados.

Acción calorígena. Incremento del consumo de oxígeno. Casi todos los tejidos periféricos contribuyen a esta respuesta; la hormona tiroidea estimula de modo notorio a corazón, músculo esquelético, hígado y riñones. Del 30 al 40% del incremento del consumo de oxígeno (dependiente de la hormona tiroidea) puede atribuirse a estimulación de la contractilidad cardíaca. Algunos órganos como el cerebro, las gónadas y el bazo no muestran respuesta a los efectos calorígenos de la hormona tiroidea. La lipogénesis dependiente de hormona tiroidea puede constituir un sumidero de energía importante desde el punto de vista cuantitativo. Un enlace entre lipogénesis y termogénesis es la estimulación de la lipólisis por la triyodotironina. Además la hormona tiroidea induce la expresión de varias enzimas lipogénicas, entre ellas, la enzima málica y la ácido grasa sintetasa.

Efectos cardiovasculares y relación con las catecolaminas. Las hormonas tiroideas influyen sobre la función cardíaca mediante efectos directos e indirectos: los cambios en el aparato cardiovascular son consecuencias clínicas notorias en estados de disfunción tiroidea. Las hormonas tiroideas aumentan el número y la afinidad de los receptores adrenérgicos beta en el corazón.

Las acciones de las hormonas tiroideas y de las catecolaminas noreadrenalina y adrenalina están íntimamente relacionadas. La adrenalina aumenta la tasa metabólica, estimula al sistema nervioso y produce efectos cardiovasculares similares a los de las hormonas tiroideas, si bien la duración de su acción es breve.

Los efectos que se pueden observar en el hipertiroidismo son : taquicardia, incremento del volumen sistólico, aumento del índice cardiaco, hipertrofia cardiaca, decremento de la resistencia vascular periférica y aumento de la presión del pulso. En el hipotiroidismo, se observa taquicardia, índice cardiaco disminuido, derrame pericárdico, incremento de la resistencia vascular periférica, disminución de la presión de pulso, y aumentos de la presión arterial media.

Efectos sobre el sistema nervioso. En el hipotiroidismo los procesos mentales son lentos y la concentración de proteínas en líquido cefalo-raquídeo está aumentada. Las hormonas tiroideas hacen retroceder esos cambios y las dosis grandes producen actividad mental rápida, irritabilidad e inquietud. El flujo sanguíneo cerebral global y los respectivos consumos de glucosa y oxígeno por el encéfalo son normales, tanto en el hipotiroidismo como en el hipertiroidismo en adultos.

Las hormonas tiroideas tienen efectos muy marcados sobre el desarrollo cerebral. En los lactantes hipotiroideos, el desarrollo de las sinapsis es anormal, hay defectos en la mielinización y un grave retardo del desarrollo mental. Los cambios mentales son irreversibles si el tratamiento de sustitución no comienza poco después del nacimiento.

Las hormonas tiroideas también tienen efectos sobre el sistema nervioso periférico. El tiempo de reacción de los reflejos miotáticos está acortado en el hipertiroidismo y prolongado en el hipotiroidismo.

Efectos sobre el metabolismo de los carbohidratos. Las hormonas tiroideas aumentan la velocidad de absorción de los carbohidratos desde el tubo digestivo, acción probablemente independiente de su efecto clorigénico. En el hipertiroidismo por esa razón, las concentraciones plasmáticas de glucosa suben con rapidez después de una comida con carbohidratos, por lo cual a veces se supera el umbral renal. No obstante, la glucemia vuela a caer con una velocidad también alta.

FARMACOCINÉTICA ^{3,4,5}

La liotironina de sodio es casi completamente absorbida en el tracto gastrointestinal (cerca del 95%) al ser administrado por vía oral. La concentración normal de triyodotironina (liotironina) plasmática es alrededor de 0.15 µg/dL equivalente a 2.3 nmol/L.

La hormona libre en plasma está en equilibrio con la hormona tiroidea unida a proteínas en el plasma y en los tejidos, siendo la hormona tiroidea que se encuentra libre en el plasma la única activa desde el punto de vista fisiológico. La unión que existe entre la hormona y las proteínas plasmáticas es fuerte, pero no covalente.

La unión de la hormona con las proteínas plasmáticas la protege contra el metabolismo y excreción, lo cual origina vidas medias prolongadas en la circulación. Ya que la triyodotironina (liotironina) se une con menos fuerza a las proteínas plasmáticas que la tiroxina, la liotironina tiene una acción farmacológica más rápida y de duración corta con respecto a la tiroxina. Las vidas medias de triyodotironina y tiroxina son aproximadamente 1-2 días y 6-7 días, respectivamente. La proporción de la triyodotironina libre es un 0.3% del total de la hormona en plasma.

Las proteínas plasmáticas que captan a las hormonas tiroideas son:

1. Albúmina.
2. Prealbúmina captadora de tiroxina o transtiretina (TBPA).
3. Globulina captadora de tiroxina (TBG).

Por lo que respecta a la triyodotironina, ésta se encuentra unida a la albúmina en un 53%, a la TBG en un 46% y en una fracción de un 1% a la TBPA.

La mayor parte del metabolismo de las hormonas tiroideas es en el hígado; la triyodotironina se conjuga con ácidos glucurónico y sulfúrico por medio del grupo hidroxilo fenólico y se excreta en la bilis. Hay circulación enterohepática y después se libera mediante hidrólisis de los conjugados en el intestino y se reabsorbe. Parte del material conjugado llega al colon sin cambios, ahí se hidroliza, y se elimina en heces como los compuestos libres.

La triyodotironina sufre desyodación formándose distintas diyodotironinas, metabolitos inactivos que son constitutivos normales del plasma humano.

Además del hígado, en el riñón y otros tejidos ocurre la desyodación de las hormonas tiroideas.

USOS DE LA LIOTIRONINA SÓDICA: ^{3,4}

La liotironina de sodio es usada ampliamente en la hormoterapia tiroidea. La liotironina se usa para remplazar o sustituir cuando hay disminución o ausencia de la función tiroidea, resultado de una deficiencia, atrofia primaria, parcial o completa de la glándula o por situaciones de cirugía, radiación, o por efecto de agentes antitiroideos; sin embargo en ocasiones se prefiere la levotiroxina de sodio por los períodos largos de terapia. La liotironina de sodio complementa la terapia en pacientes con hipotiroidismo secundario (insuficiencia hipofisaria) y en hipotiroidismo terciario (insuficiencia hipotalámica). La terapia se debe mantener sin interrupción para controlar los síntomas de hipotiroidismo.

La liotironina de sodio se utiliza cuando la absorción de levotiroxina de sodio no es completa o cuando sea posible la alteración de la conversión de tiroxina en triyodotironina en los tejidos periféricos.

La liotironina de sodio se usa intravenosamente en el tratamiento del coma y precoma por mixedema. Se requiere la administración simultánea de corticosteroides. El coma por mixedema se considera una urgencia médica, e incluso con diagnóstico y tratamientos tempranos, la mortalidad puede ser hasta del 60%. Los factores precipitantes habituales incluyen infecciones pulmonares, enfermedades cerebrovasculares e insuficiencia cardíaca congestiva.

DOSIS: ⁵

La dosis debe ajustarse de acuerdo con los requerimientos y respuestas individuales, por lo que se recomienda iniciar el tratamiento con dosis bajas e ir aumentando en lapsos de 15 días hasta obtener la respuesta terapéutica óptima.

En pacientes ancianos, debe administrarse con precaución ya que es común la presencia oculta de enfermedades cardiovasculares. En estos casos debe iniciarse el tratamiento con dosis bajas y si se presentan síntomas o se agravan los existentes, debe disminuirse la dosis.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS.

La validación de un método analítico, se define como el proceso por el cual queda establecido, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas.⁷

Los parámetros a evaluar durante la validación de un método depende de la aplicación que se le de a éste. La USP 26 en pruebas generales <1225> establece 3 categorías para los métodos analíticos.⁸

Categoría I: ensayos desarrollados para cuantificar el componente mayor de la formulación (activos) y conservadores.

Categoría II: ensayos que son usados para la determinación de impurezas o productos de degradación en producto terminado. Estos incluyen ensayos cuantitativos y/o pruebas límite.

Categoría III: ensayos usados para determinar la biodisponibilidad de un activo en producto terminado.

Apegándonos a esta clasificación, la validación del método analítico utilizado para la validación del proceso de limpieza corresponde a la categoría II.⁹ La cual requiere que se evalúen los siguientes parámetros :

1. Linearidad y precisión del sistema
1. Especificidad
1. Linearidad y exactitud del método
4. Reproducibilidad
5. Estabilidad de la muestra y solución estándar
6. Tolerancia
7. Cantidad mínima detectable
8. Cantidad mínima cuantificable

Para entender de forma clara cada uno de los parámetros de la validación a continuación se presentan sus definiciones.⁹

LINEARIDAD. La linearidad de un sistema o método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente

o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

INTERVALO. El intervalo de un método analítico está definido por las concentraciones comprendidas entre los niveles de concentración superior e inferior de la sustancia (incluyendo estos niveles), en el cual se ha demostrado que el método es preciso, exacto y lineal.

EXACTITUD. La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de la sustancia.

PRECISIÓN. La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar o del coeficiente de variación. La precisión es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

a) **REPETIBILIDAD.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc.)

b) **REPRODUCIBILIDAD.** Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas bajo las condiciones diferentes (diferentes analistas, en diferentes días, en el mismo y/o diferente laboratorio, utilizando el mismo y/o diferentes equipos, etc.)

LÍMITE DE DETECCIÓN. Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones de operación establecidas.

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN. Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones de operación establecidas.

ESPECIFICIDAD. Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra.

TOLERANCIA. La tolerancia de un método analítico es el grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones de las condiciones normales de operación, tales como diferentes temperaturas, lotes de reactivos, columnas, sistema de elución, tipos de empaque (soporte, fase estacionaria, etc.).

ESTABILIDAD DE LA MUESTRA. Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

(HPLC)

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) es una técnica de separación, cuyo sistema está constituido por dos fases no miscibles, una estacionaria (sólido o líquido impregnado sobre un soporte) y una móvil (disolvente o mezcla de disolventes). La fase estacionaria se encuentra empacada en una columna a través de la cual se hace fluir, en forma continua la fase móvil; los componentes de la muestra presentan un equilibrio de distribución entre estas dos fases, y este equilibrio determina la velocidad con la cual cada componente migra a través del sistema.¹⁰

Un cromatógrafo de líquidos consiste en: Recipiente(s) para la fase móvil, bomba, inyector, columna cromatográfica, detector e integrador (computadora, registro de datos). Ver fig 1.

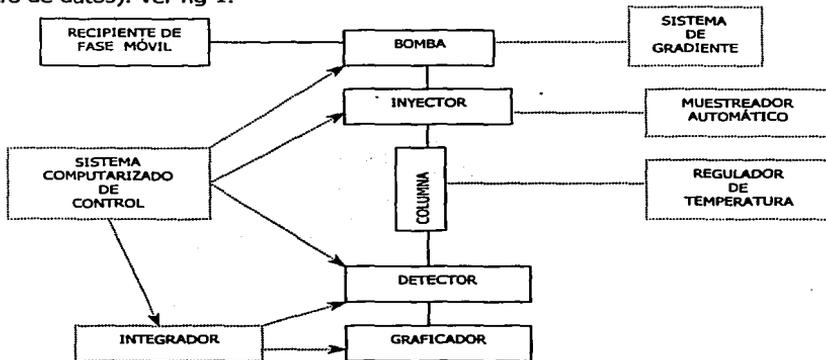


Fig 1. Diagrama de bloques de un sistema de Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

BOMBA.¹¹ El sistema de bomba pasa la fase móvil por la columna cromatográfica. Los sistemas modernos consisten en una o más bombas controladas por computadoras, las cuales pueden ser programadas variando las proporciones de los componentes de la fase móvil, como gradientes cromatográficos, o mezclas isocráticas de la fase móvil.

Las bombas usadas para un análisis cuantitativo deben ser construidas de material inerte para los componentes corrosivos de la fase móvil y ser capaces de mandar un flujo constante con mínimas fluctuaciones en amplios períodos de tiempo.

Las bombas actuales son de diafragma o de pistón. Como se puede ver en la figura 2, el elemento unitario está constituido por:

1. Una cámara de bombeo de alta presión y bajo volumen.
2. Un elemento móvil alternativo que provoca el movimiento del líquido.
3. Dos válvulas de retención funcionando en sentido contrario para asegurar el flujo.

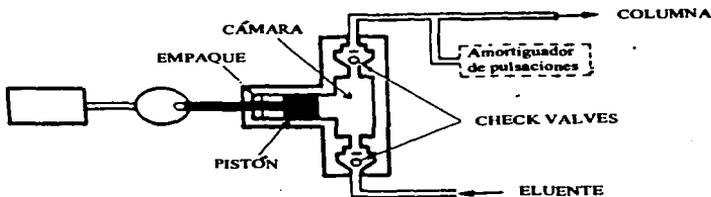


Fig 2. Esquema de elemento unitario de una bomba.

La bomba de diafragma es muy confiable pero necesita un sistema de regulación más sofisticado para asegurar un flujo constante debido a la deformación elástica del acero de la membrana en función de la presión.

La bomba de pistón permite una excelente regulación del flujo pero necesita un empaque especial para el pistón. Es mucho más utilizada.

Todos los modelos comerciales son concebidos a partir del elemento unitario con diferentes combinaciones para permitir una buena regulación de flujo y la supresión de las pulsaciones.

En efecto, el movimiento del pistón para cargar y descargar la cámara provoca pulsaciones del flujo que afectan el buen funcionamiento de otros elementos del cromatógrafo.

INYECTOR.¹⁰ Las válvulas de inyección son los dispositivos más utilizados para la introducción de la muestra al sistema cromatográfico. Se les puede integrar un "loop" intercambiabile que consiste en un capilar de acero inoxidable y de volumen fijo, lo que permite inyectar siempre el mismo volumen de muestra.

Como se puede ver en la figura 3, este inyector es una válvula de alta presión con 6 ó 4 puertas y dos posiciones.

1. Posición de carga, donde se llena el "loop" con la muestra a presión atmosférica.
2. Posición de inyección, donde se coloca al loop lleno de muestra en la corriente de la fase móvil, con la subsecuente inyección en la parte superior de la columna, sin interrupción significativa del flujo.

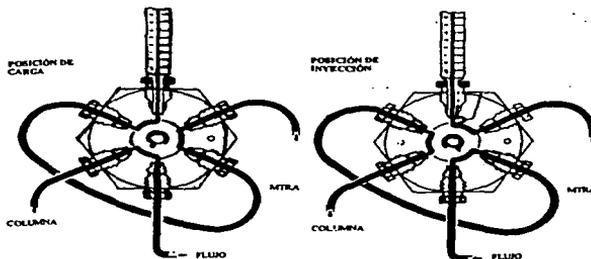


Fig. 3. "Loop" de inyección.

La inyección en "loop" lleno permite alcanzar una excelente reproducibilidad del volumen inyectado y el uso de estándar interno no es necesario.

Existen también equipos de muestreo automático, muchos de ellos usan el mismo tipo de válvulas con sistema automático de limpieza e introducción de la muestra al sistema cromatográfico.

COLUMNA.¹² En muchos análisis farmacéuticos, la separación se lleva a cabo por el fenómeno de partición de los compuestos entre la fase móvil y la fase estacionaria. El sistema que consiste de una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar es llamado fase normal, y se llama fase reversa cuando la fase móvil es polar y la fase estacionaria no polar.

La diferencia en afinidad de un compuesto por la fase estacionaria o la fase móvil es la que va a determinar el tiempo de retención del compuesto en la columna.

La cromatografía en fase reversa, es la más empleada actualmente y consiste de una base de sílice u otros materiales que se encuentran adicionados por algún compuesto. Por tanto la polaridad de la columna estará limitada por la polaridad del grupo funcional añadido.

Las columnas están constituidas por con una pared gruesa de acero inoxidable para resistir altas presiones y la acción química de la fase móvil. El interior es liso, de calibre uniforme y el contenido se retiene mediante filtros de acero poroso. Este contenido generalmente es sílice o alúmina, y cuenta con un tamaño de partícula de 3 a 10 μm de diámetro, pero las hay arriba de 50 μm o más para columnas preparativas. Las columnas usadas en análisis de fármacos tienen un diámetro interno de 2 a 5 mm y su longitud es de 10 a 30 cm, pero también las hay de 3 a 8 cm de longitud, lo cual permite obtener menores tiempos de análisis y disminuir el consumo de disolventes. Las columnas pueden calentarse para dar separaciones más eficientes, sin embargo, raramente se usan temperaturas por encima de 60°C, ya que la fase estacionaria se puede degradar y la fase móvil evaporarse. A menos que lo indique la monografía, el uso de la columna es a temperatura ambiente.

La cromatografía de intercambio iónico es usada para separar compuestos ionizables solubles en agua, de masa molecular inferior a 1500. Las fases estacionarias son resinas orgánicas sintéticas; las resinas intercambiadoras de cationes contienen cargas negativas activas y se emplean para separar sustancias básicas, tales como las aminas. Las resinas intercambiadoras de aniones, tienen grupos con cargas positivas activas y separan compuestos que contengan cargas negativas, tales como fosfatos, sulfonatos, carboxilo, etc. Los compuestos son atraídos por la resina, y las diferencias de afinidad provocan la separación.

Factores tales como el pH de la fase móvil, polaridad, temperatura, tipo y concentración de iones afectan el equilibrio en el sistema cromatográfico y pueden ser modificados para obtener la separación deseada.

En cromatografía de exclusión, las columnas están empacadas con una fase estacionaria porosa. Los compuestos son retenidos de acuerdo a su tamaño. Las moléculas pequeñas entran a estos poros y se incrementa la retención en comparación con moléculas que no entran a los poros, es decir las de mayor tamaño.

DETECTOR.¹⁰ Los compuestos separados en la columna y arrastrados a diferentes tiempos por la fase móvil, llegan al detector que recibe cantidades puntuales de material a flujo constante.

Los detectores son sensibles a diferentes propiedades, por ejemplo, absorbancia, índice de refracción, radioactividad, conductividad, fluorescencia, y amperaje.

La longitud del tubo que conecta la columna con el detector debe ser lo más pequeña posible, no mayor a 200 mm y su diámetro es el aspecto más crítico, por tanto debe ser muy delgado.

El detector lee una muestra diluida en relación a la inyectada. Este factor de dilución varía de 5 a 350 y depende de la longitud y diámetro interno de la columna, el volumen de la muestra, el número de platos y el volumen de retención.

Detector de índice de refracción.

Es un detector universal. La señal es la diferencia entre el índice de refracción de la celda que recibe el eluyente de la columna y la celda de referencia que contiene el eluyente empleado. El soluto provoca una variación del índice en la celda de medida proporcional a la concentración.

El detector de índice de refracción no es muy sensible y su límite de detección es en general del orden de 0.1 a 1 µg inyectados. Además es sensible a la temperatura y a las variaciones de flujo y no puede utilizarse con gradiente de elución. Su respuesta es casi universal a todos los solutos como carbohidratos y polímeros alifáticos con baja absorción en el ultravioleta.

Existen tres tipos de detectores de índice de refracción:

1. De reflexión, la celda está colocada entre una superficie reflejante y un prisma. La variación del índice de refracción creada por el soluto provoca una variación entre el reparto refracción/reflexión.
2. De desviación, la celda está ubicada en un prisma hueco. El soluto provoca una variación del ángulo de salida del haz luminoso.
3. Interferométrico, se observa el desplazamiento de una red de interferencias por el cambio de índice provocado por el paso del soluto.

Detector de fluorescencia.

Utiliza las propiedades de fluorescencia de ciertas moléculas. En casos favorables, es un detector muy sensible que permite detectar hasta picogramos de soluto. Es un detector altamente específico que puede utilizarse con gradiente de elución. Es poco sensible a las variaciones de flujo y de temperatura.

Menos del 20% de las moléculas presentan fluorescencia natural, lo que limita el uso de este detector. Sin embargo, la aparición de reactivos de derivatización eficientes ha permitido un desarrollo importante.

Detector de luz U.V.

Son los más utilizados y representan al 80% de los detectores de HPLC. El principio de detección está basado en la absorción de luz por el soluto, regido por la ley de Lambert-Beer.

Muchas moléculas tienen absorbancia en la zona U.V. y la gran mayoría en U.V. de baja longitud de onda (190/210), es decir que según la longitud de onda, el detector de luz U.V. es específico o casi universal. Sin embargo, a baja longitud de onda, existen pocos disolventes de baja absorbancia (agua, acetonitrilo, hidrocarburos saturados).

El detector de U.V. no necesita en la actualidad celda de referencia y la eventual absorbancia del eluyente está compensada electrónicamente. Son poco sensibles a la temperatura y a las variaciones de flujo.

Detector de arreglo de diodos.

El detector no posee monocromador para elegir la longitud de onda. Un haz de luz policromática atraviesa la celda y es dispersada después. Un conjunto de diodos recibe el haz fraccionado, lo que permite registrar en cada momento la totalidad del espectro U.V.-Visible.

Detector de longitud de onda fija

Es el detector más sencillo. La fuente U.V. es una lámpara de vapor de mercurio que proporciona una longitud de onda de 254 nm, con posibilidad de utilizar una longitud de onda secundaria de 280 nm.

Detector de longitud de onda variable

Es el detector más usado. Permite trabajar en general de 190 a 600 nm con selección continua manual de la longitud de onda. Los aparatos integrados y computarizados permiten el cambio de longitud de onda programable a tiempos pre-establecidos.

INTEGRADOR.¹⁰ Generalmente el detector se conecta a un registrador o integrador, un sistema que cambia la señal analógica del detector a una digital.

Al terminar la elución el aparato proporciona una serie de información respecto a los picos, sus tiempos de retención, altura o áreas, anchura del pico, altura o área total y porcentaje de cada pico. De esta manera la información puede almacenarse o reconfigurarse según las necesidades del analista y el integrador puede estar a su vez conectado en serie a una computadora con softwares variados que dan mucha flexibilidad a la información obtenida.

PARÁMETROS A EVALUAR EN LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.¹⁰

Coefficiente de reparto (k). Es la relación de equilibrio de distribución del soluto entre las dos fases.

$$k = C_s / C_m$$

donde C_s y C_m son las concentraciones de soluto en la fase estacionaria y móvil respectivamente.

Factor de capacidad (k'). Relaciona la cantidad de soluto en las dos fases.

$$k' = \frac{\text{cantidad de sustancia en fase estacionaria}}{\text{cantidad de sustancia en fase móvil}}$$

$$k' = t_R - t_M / t_M$$

donde t_R y t_M son tiempos de retención y tiempo muerto respectivamente.

Tiempo de retención (t_R). Es el tiempo transcurrido desde la introducción de la muestra hasta que el detector registra el máximo del pico. Es característico de un soluto dado, siempre y cuando se conserven las mismas condiciones de operación.

Tiempo muerto (t_M). Es el tiempo que tarda en salir una sustancia no retenida.

Número de platos (N).¹² Es una contribución cinética y corresponde a la medida de como está empacada una columna. A mayor número de platos, mayor eficiencia.

$$N = 16(t/w)^2$$

donde t es el tiempo de retención de la sustancia y w es el ancho del pico en su base.

Eficiencia de la columna. Expresa el grado de ensanchamiento que sufren las bandas de los solutos al migrar a través de la columna.

Factor de selectividad (α). Expresa la diferencia en los equilibrios de distribución entre dos solutos.

$$\alpha = k'_2/k'_1$$

Factor de asimetría (FA). Es una forma muy común de alejamiento de la curva gaussiana. Un pico tiene un factor de simetría de uno, cuando sus dos mitades divididas por un eje son iguales. Es recomendable leer a partir del 10% de la altura del pico por razón que la línea base presenta ruido a causa del detector y se hace evidente una asimetría.

Coleo. Cuando el factor de asimetría del pico es diferente a uno.

Resolución (R_s).^{10,12} Es el grado de separación de dos bandas. Es la distancia entre los picos de las bandas dividida entre el ancho promedio de las bandas.

La resolución es una función de tres factores: la selectividad del sistema cromatográfico, la velocidad de la migración que varía con k' y la eficiencia; los primeros dos conceptos son termodinámicos, el último es cinético.

$$R_s = (t_2 - t_1) / (w_2/2 + w_1/2)$$

donde t_2 es mayor t_1 .

Si se considera que para picos adyacentes la anchura a la base es muy similar, $w_2 = w_1 = 4\sigma$. La resolución también se expresa como:

$$R_s = (N^{1/2}/4) * (\alpha - 1/\alpha) * (k'_2/1 + k'_2)$$

Y por ello para optimizar una separación puede modificarse la eficiencia, retención o la selectividad.

ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJO

Conceptos generales

Radiación Electromagnética.¹³

La radiación electromagnética es una forma de energía que se puede describir en función de sus propiedades ondulatorias. Cada tipo de radiación electromagnética se caracteriza por su longitud de onda (λ). La longitud de onda de un haz de radiación electromagnética se define como la distancia lineal que abraza el ciclo entero de una onda.

Además de caracterizarse por su longitud de onda, las radiaciones se caracterizan por su frecuencia (ν), que se define como el número de ciclos completos por segundo (cps), su unidad de medida es el Hertz (Hz)¹⁴. La longitud de onda y frecuencia son inversamente proporcionales. Esta relación puede expresarse matemáticamente como:

$$\nu = c / \lambda$$

donde: ν es la frecuencia en Hertz, λ es la longitud de onda en cm y c es la velocidad. La velocidad varía con el medio a través del cual la radiación se propaga; en el vacío tiene un valor de 3×10^{10} cm/seg.

En algunas interacciones con la materia, puede demostrarse que la radiación se comporta como si estuviera constituida por paquetes discretos de energía, denominados fotones. La energía de un fotón es variable y depende de la frecuencia o de la longitud de onda de la radiación. La relación que existe entre la energía E de un fotón y su frecuencia viene dada por:

$$E = h \nu$$

Donde h es la constante de Planck (6.62×10^{-27} erg por segundo). La relación entre E y la longitud de onda es:

$$E = hc / \lambda$$

En cuanto a los fenómenos de refracción y difracción la radiación electromagnética se explica mejor asignándole propiedades de onda y se le asignan propiedades de fotón (energía corpuscular) en cuanto a su interacción con la materia, siendo la energía corpuscular igual a $h \nu$.

El espectro de radiación electromagnética cubre un inmenso campo de longitudes de onda. En la siguiente figura se esquematizan las divisiones más importantes del espectro.

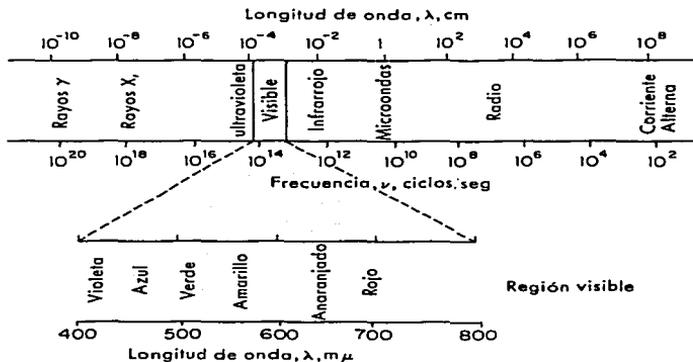


Fig. 4. Espectro de radiación electromagnética.

RADIACIÓN INFRARROJA.^{13,15}

La espectrofotometría de infrarrojo ha sido una de las herramientas más potentes para la identificación cualitativa, sin embargo en la actualidad ya se cuenta con análisis cuantitativos en la industria farmacéutica.

La radiación infrarroja es producida por cuerpos calientes y permiten el estudio de los movimientos vibracionales de las moléculas.

En espectroscopía de I.R., la frecuencia se expresa mediante el número de onda¹⁴, es decir, el número de ciclos completos por centímetro. El número de onda es el inverso de la longitud de onda y se mide en cm^{-1} .

El infrarrojo se divide para su estudio en tres regiones, las cuales producen diferentes efectos vibracionales en las moléculas como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 1. Efectos vibracionales en el Infrarrojo (IR)

I.R.Cercano	I.R. Medio	I.R. Lejano
Produce armónicos de las vibraciones de tensión del hidrógeno	Produce vibraciones fundamentales de la molécula	Produce vibraciones del esqueleto y vibraciones de compuestos orgánicos
Su número de onda va de 13300 a 4000 cm^{-1}	Su número de onda va de 4000 a 400 cm^{-1}	Su número de onda va de 400 a 20 cm^{-1}

Las moléculas que tienen átomos enlazados por uniones covalentes, presentan vibraciones u oscilaciones, las cuales pueden ser de torsión, flexión, rotación y vibración. Cuando estas moléculas absorben radiación infrarroja la energía de esta radiación produce un aumento en su energía vibracional, lo cual se traduce en un aumento en la amplitud de las vibraciones de los átomos enlazados, por consiguiente la molécula se sitúa en un estado vibracional excitado.

Para que se produzca la absorción de radiación Infrarroja son necesarias dos condiciones:

- La energía de la radiación debe coincidir con la diferencia de energía que existe entre los estados de excitación y basal de la molécula.
- El cambio de energía en la molécula debe producir un cambio en el momento dipolar de la molécula.

Por lo anterior, es necesario un enlace covalente y un momento dipolo para producir absorción en el infrarrojo.

Los accesorios y celdas empleados en espectroscopía de infrarrojo son de NaCl, KBr y ZnSe, entre otras, presentan la característica de no absorber el infrarrojo, asegurando así que solo la muestra absorberá la radiación.

El vidrio tipo Pyrex y otros tipos de vidrios si presentan absorción en el infrarrojo por lo consiguiente no se usan ni para celdas ni en la óptica del aparato. En la óptica del espectrofotómetro se usan espejos para evitar problemas de absorción.

MOVIMIENTOS VIBRACIONALES.¹⁴

Existen dos tipos de vibraciones fundamentales en las moléculas: 1. "Stretching" o estiramiento y 2. "Bending" o deformación



Fig 5. Movimientos vibracionales de una molécula.

1. "Stretching" o estiramiento. Estas vibraciones se caracterizan por un cambio en la distancia interatómica a lo largo del enlace entre dos átomos. En el estiramiento simétrico no hay cambio en el momento dipolar, y por consiguiente no se produce absorción en el espectro infrarrojo. En el estiramiento asimétrico hay un cambio en el momento dipolar y esta vibración sí produce absorción en el infrarrojo.

2. "Bending" o deformación. Esta vibración se caracteriza por un cambio en el ángulo de enlace de tres átomos. Se conocen cuatro tipos básicos de vibraciones:

- a) De tijera. Dos átomos unidos a un átomo común se mueven en un mismo plano acercándose y alejándose uno de otro.
- b) De oscilación. Los átomos unidos a un átomo común se mueven de manera alterna de un lado hacia otro en el plano de simetría de la molécula.
- c) De sacudida. Los átomos unidos a un átomo común se mueven simultáneamente hacia fuera del plano de la molécula.
- d) De torsión. Los átomos unidos a un átomo común se mueven de manera alterna hacia fuera del plano de la molécula.

ESPECTROFOTÓMETRO DE INFRARROJO POR TRANSFORMADAS DE FURIER (FTIR)¹⁴

El espectrofotómetro infrarrojo de transformadas de Fourier tiene su base en que no dispersa la luz sino que utiliza un interferómetro generando una señal llamada interferograma. Este interferograma se somete a un tratamiento matemático por medio de transformadas de Fourier para producir un espectrograma. Los cálculos de conversión se realizan por medio de una computadora.

El *principio de funcionamiento* del espectrofotómetro es el interferómetro de Michelson (ver figura 6), que tiene una fuente luminosa de luz infrarroja policromática. Esta luz llega a un divisor de haz de KBr que se encuentra colocado formando un ángulo de 45° y con un tenue recubrimiento de germanio en la parte posterior. Su función es dividir el haz que se genera en la parte superior y cuya función es devolver el haz hacia el divisor. El segundo haz no se refleja, sino que pasa a través del divisor de haz hacia un espejo que tiene un movimiento lineal el cual sirve para introducir una variable llamada diferencia de paso óptico. Por último los dos haces se combinan nuevamente en el divisor de haz y los espejos. La radiación así recombinada llega a la muestra y por último al detector.

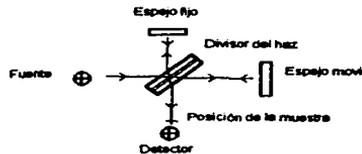


Fig 6. Interferómetro de Michelson

Durante el trayecto del haz infrarrojo corre paralelamente un rayo láser de helio-neón que proporciona el valor de la frecuencia de manera exacta.

Esta técnica permite aislar del ruido ambiental señales sumamente débiles que se den en fuentes lejanas. Su primera aplicación fue en la región del lejano infrarrojo.

PRINCIPALES COMPONENTES DE UN ESPECTROFOTÓMETRO DE INFRARROJO POR TRANSFORMADAS DE FOURIER.

Fuente de radiación infrarroja. La fuente consiste de un sólido inerte calentado a temperaturas entre 1500 y 2200 K, que produce una radiación continua que se aproxima bastante a la radiación de cuerpo negro. La máxima intensidad se obtiene entre 5000 y 5900 cm^{-1} .

Tipos de Fuentes:

Emisor Nernst. Es un cilindro de diámetro de 1 a 2 mm y longitud de 20 mm compuesto de óxidos de tierras raras, tiene conductores de platino en los extremos que permiten el paso de la electricidad, alcanza temperaturas de 1200 a 2200 K.

Fuente global. Es una varilla de 5 mm de diámetro y 50 mm de largo compuesta de carburo de silicio, se calienta eléctricamente a temperaturas entre 1300 y 1500 K.

Fuente de filamento incandescente. Tiene menor intensidad que las anteriores pero mayor tiempo de vida. Es una espiral de nicromel que se calienta por el paso de una corriente eléctrica.

Arco de mercurio. Para el infrarrojo lejano se usa un tubo de cuarzo con vapor de mercurio a presión mayor de una atmósfera, el paso de la electricidad a través del vapor origina una fuente de plasma que proporciona una fuente de radiación continua.

Fuente láser de dióxido de carbono. Es un láser de dióxido de carbono que trabaja entre 900 a 1100 cm^{-1} . Dado que solo trabaja en un rango muy limitado donde se ven modos de tensión interactivos se usa solo para fines de investigación en contaminantes atmosféricos.

Interferómetro de Michelson. Tiene un divisor de haz de radiación (transmite un 50% y refleja otro 50%) cuando se recombinan los haces se puede obtener un patrón de interferencia conforme se varía la diferencia de la trayectoria (ver principio de funcionamiento en pág. 32).

Detectores de infrarrojo. En el FTIR se tienen los piroeléctricos y los fotoconductores.

Detectores piroeléctricos. Se construyen con láminas cristalinas de materiales piroeléctricos los cuales son aislantes (materiales dieléctricos). Al colocar el material piroeléctrico entre las placas de dos electrodos se produce una capacitancia dependiente de la temperatura. La radiación infrarroja al incidir sobre el cristal altera la distribución de cargas lo que se detecta como una corriente en un circuito eléctrico externo conectado a las dos caras del condensador. Los cristales piroeléctricos pierden su polarización cuando se calienta a una temperatura denominada el punto Curie. Su tiempo de respuesta es rápido.

Un ejemplo de este tipo de detectores es el de sulfato de triglicerina, ya sea deuterado o con una fracción de glicina sustituida por alanina.

Detectores fotoconductores. Consisten de una película de un material semiconductor depositada en una superficie de vidrio no conductora y sellada en una cámara al vacío para proteger el semiconductor de la atmósfera. La radiación infrarroja promueve el movimiento de electrones de valencia no conductores a estados conductores de más alta energía, disminuyendo la resistencia eléctrica del semiconductor.

Sistema de procesamiento de datos. Un sistema de cómputo capaz de realizar las operaciones matemáticas de transformadas de Fourier en el que incluye el software "Quant +" para la posterior predicción de muestras desconocidas.

Software Quant +^{16,17}

El paquete de software Quant+ está diseñado para realizar el análisis cuantitativo de sistemas multicomponentes, mediante el análisis del espectro por un algoritmo en específico como lo es la descomposición de datos por mínimos cuadrados parciales, PLS1. Este análisis establece una relación entre los espectros y las concentraciones de los estándares de la curva de calibración. Posteriormente, esta relación se utiliza para predecir muestras desconocidas.

DESCOMPOSICIÓN DE DATOS POR MÍNIMOS CUADRADOS PARCIALES (PLS1).

Las técnicas de descomposición espectral, se encargan de identificar las principales variaciones en todos los espectros de la curva de calibración y obtienen un "espectro" de cada una de las variaciones. Estos "espectros" no son semejantes a los espectros reales, son una representación matemática de todas las variaciones independientes en los datos.

Este grupo de "espectros" matemáticos se conocen como factores. Cada espectro del grupo original de datos se reconstruye multiplicando cada factor por una fracción escalar y los resultados se suman hasta que el espectro en construcción coincida con el espectro original. Las fracciones se conocen como escores, es decir, cuanto de cada factor se necesita para reconstruir el espectro original.

Este proceso, reduce grandemente la complejidad de los datos, de tal forma que con un número pequeño de factores y escores se puede reconstruir cualquier espectro de una muestra desconocida. Esta colección de escores y factores se conoce también como un modelo para los datos de la curva de calibración. Cada espectro de calibración tendrá su propio y único grupo de escores, pero el mismo grupo de factores, puesto que siempre se utilizan los mismos factores para modelar los espectros de calibración. Así cada espectro se puede representar por una serie de escores, en el espacio factor, en lugar de una serie de intensidades, en el espacio longitud de onda. Esta forma totalmente diferente de representar una serie de espectros, dispone de un modelo matemático, el cual inicia con un grupo de espectros que representan la composición de las muestras de la curva de calibración.

En resumen, la descomposición espectral consiste en hallar una serie de factores para reproducir los espectros de la curva de calibración, combinándolos en diferentes proporciones.

Después de ejecutar la descomposición espectral, se correlacionan los escores y las concentraciones de las muestras de la curva de calibración mediante regresión lineal múltiple, para producir un grupo de coeficientes de regresión. Este grupo de coeficientes de regresión se utiliza para predecir las concentraciones de muestras desconocidas, partiendo únicamente de los espectros.

En una regresión lineal normal, las absorbancias se regresionan contra las concentraciones. En una regresión lineal múltiple, los escores se regresionan contra las concentraciones.

La predicción de las propiedades de interés para muestras desconocidas consiste en ajustar las cantidades de cada factor en el espectro desconocido y utilizar éstas en las ecuaciones de regresión.

Las *etapas* para un análisis de cuantificación por espectrofotometría de infrarrojo empleando un FTIR y el software Quant + con algoritmo PLS1 son:

➤ Construcción del método.

Se especifican todos los parámetros necesarios en la calibración y posterior predicción.

➤ Calibración.

En esta etapa se aplica un algoritmo que reduce el conjunto de datos originales a un conjunto de factores y escores.

El software Quant + utiliza la técnica de descomposición de datos mínimos cuadrados parciales (PLS) para reducir cada espectro a un pequeño número de factores, necesarios para representar todas las fuentes de variación en la curva de calibración.

Mediante regresión lineal múltiple (MLR), establece las correlaciones entre los escores (cantidad de cada factor) y las concentraciones de cada propiedad en los estándares de calibración

➤ Validación.

Los procedimientos matemáticos que utiliza el software Quant + para realizar la validación no son los mismos que se utilizan en una validación de método analítico; soamente se comprueba la capacidad del modelo para analizar muestras desconocidas después que se calibra el método.

PARÁMETROS NECESARIOS PARA OBTENER UN BUEN ESPECTRO.¹⁶

Background. Espectro de cuerpo negro de la fuente más el espectro del medio ambiente.

Resolución. Capacidad para distinguir entre un pico y otro del espectro.

Apodización. Operación matemática que reduce oscilaciones no deseadas de los lados de las bandas del espectro. Las oscilaciones son reducidas al multiplicar el interferograma por una función que decrece constantemente como la aproximación a la diferencia máxima de la trayectoria. La apodización reduce ruido del espectro.

Número de barridos (scan). Número de veces que se realiza la lectura de la muestra. Disminuye ruido en una proporción \sqrt{n} (n = número de barridos).

OPD, (optical path difference). Es la diferencia de trayectoria óptica entre dos emisiones del interferómetro.

ACCESORIO DE REFRACTANCIA TOTAL ATENUADA (ATR)¹⁸

El ATR es el accesorio que se empleará principalmente en el desarrollo experimental, ante ello se da una breve explicación de éste.

En la técnica de Refractancia Total Atenuada, se emite la radiación infrarroja a un cristal de refracción. En este cristal se coloca la muestra, de tal forma que la onda continúa más allá de la superficie del cristal, es decir dentro de la muestra.

La penetración a la muestra es generalmente del orden de micras, lo que significa que se puede trabajar con pequeñas cantidades de muestra.

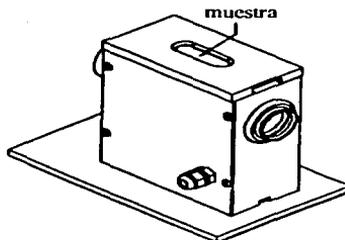


Fig 7. Esquema del accesorio de ATR

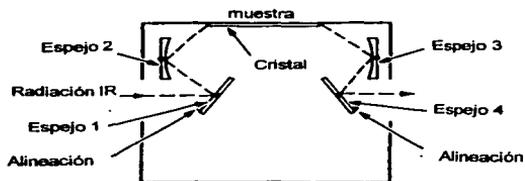


Fig 8. Principio del accesorio de ATR

Características del ATR

- * Cristal de ZnSe
- * Duro y fácil de romper
- * Solventes que atacan el material: ácidos y bases fuertes.
- * Intervalo de transmisión: $17000-650 \text{ cm}^{-1}$
- * Densidad: 5.27 g/cm^3
- * Índice de refracción por $1000 \text{ cm}^{-1} = 2.4$
- * Limpieza: acetona y agua.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DETERMINACIÓN DE CARBONO ORGÁNICO TOTAL¹⁹

(TOC)

El análisis de Carbono Orgánico Total (TOC) involucra la oxidación del carbono y la detección del dióxido de carbono producido durante la oxidación. La oxidación puede ser inducida por algunos métodos, entre los que se incluyen oxidación fotocatalítica, oxidación química y combustión a altas temperaturas.

Fundamento.¹⁹

El analizador TOC-5000 Shimadzu es capaz de medir independientemente el Carbono Total (TC), Carbono Orgánico Total (TOC) y Carbono Inorgánico (IC) en agua. El instrumento mide las especies orgánicas que por combustión producen dióxido de carbono (CO₂) y agua. Un detector de IR no dispersivo se emplea para medir el CO₂ producido durante la combustión. Esta combustión es a altas temperaturas y las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:

Reacciones de catálisis por combustión:

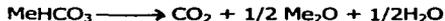
- Oxidación de compuestos orgánicos



- Oxidación de carbonatos



- Oxidación de bicarbonatos



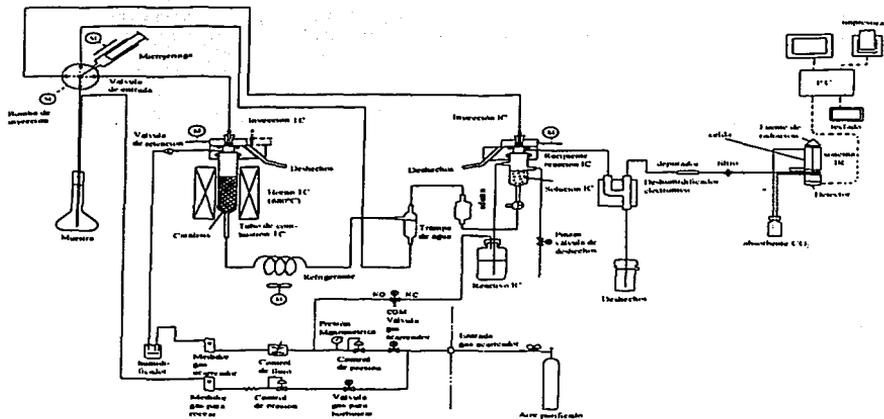


Fig. 9 Analizador de Carbono Orgánico Total

Definiciones.²⁰

Carbono Total (TC)

Es la suma de todas las especies de carbono orgánico e inorgánico.

Carbono Orgánico Total (TOC)

Son todas las formas de carbono orgánico disuelto o suspendido en agua.

Carbono Inorgánico Total (IC)

Carbono proveniente de las sales de carbonato, carbonato ácido y dióxido de carbono ambiental.

Carbono Orgánico Purgable (POC)

Componente del TOC que se libera al burbujear la muestra con aire de alta pureza.

Carbono Orgánico no Purgable (NPOC)

Componente del TOC que no se libera al purgar la muestra con aire de alta pureza.

Medición de TC.¹⁹

El tubo de combustión TC se llena con catalizador TC y se calienta a 680°C. El CO₂ de la combustión es arrastrado por el gas acarreador (aire de alta pureza) que se ajusta a una velocidad de flujo de 150 mL/min. Posteriormente la mezcla de reacción se enfría y deshumidifica. El paso de la muestra por un detector de I.R. permite la identificación del CO₂ generado, el cual es comparado con una curva de calibración previamente determinada.

Medición de IC.¹⁹

La muestra se introduce al recipiente de reacción de IC (contiene ácido fosfórico). El gas acarreador tiene un flujo continuo y es burbujeadado con aire de alta pureza. Solamente los componentes de IC en la muestra se descomponen para formar CO₂, que pasa por el detector de infrarrojo. La concentración de IC se determina interpolando en una curva de calibración previamente realizada, para ello se utilizan sales de carbonatos o carbonatos ácidos.

Medición de TOC¹⁹

La concentración de TOC se determina de la siguiente manera:

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

esta diferencia es la que se obtiene directamente del Analizador de Carbono Orgánico Total TOC-5000. La concentración de TOC se determina de la siguiente manera: la muestra se acidifica manualmente y después se burbujea la solución con aire de alta pureza para remover completamente los componentes de IC.

Medición de NPOC. ¹⁹

El NPOC se refiere específicamente a compuestos orgánicos no volátiles, los cuales no son eliminados durante el proceso de burbujeo. Los compuestos orgánicos volátiles que son solventes orgánicos que difícilmente se solubilizan en agua son eliminados al burbujear y calentar la muestra. El carbono orgánico que se desplaza durante el burbujeo se llama POC (Carbono Orgánico Purgable).

VALIDACIÓN DE LIMPIEZA Y CRITERIOS DE ACEPTACIÓN ^{21,22}

El término "validación de limpieza" comienza a ser popular a finales de la década de los ochenta y surge a partir de la necesidad de contar con equipos limpios para prevenir la contaminación de los productos fabricados.

Así, validación de limpieza se define como: proceso para asegurar que los procedimientos de limpieza de los equipos eliminan residuos a niveles previamente determinados como aceptables. ²³

Algunos límites que han sido mencionados por los representantes de la industria, en la literatura o en presentaciones incluyen la detección analítica de niveles tales como 10 ppm, niveles de actividad biológica tales como 1/1000 de la dosis terapéutica normal y niveles organolépticos tales como residuos no visibles.

La forma en que el laboratorio Nysco de México S.A. de C.V. los ha establecido es en base al límite en el producto subsecuente, límite por área superficial y límites en la muestra analizada, basados en la fórmula de límite de producto subsecuente de Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing por Destin A. LeBlanc, pág 138. Siendo lo que a continuación se describe. ²⁴

Se debe contar con:

- ✓ Lista de los equipos en los cuales es fabricado el producto de interés.
- ✓ Productos fabricados en cada uno de los equipos.
- ✓ Área superficial de contacto con el producto.

Además por producto se debe contar con:

- ✓ Tamaño de lote (Kg o L).
- ✓ Dosis mínima diaria en mg de principio activo.
- ✓ Dosis letal 50 (DL₅₀) de los principios activos.
- ✓ Dosis máxima diaria en unidades de dosis.
- ✓ Peso unitario

Para el peor de los casos se selecciona:

- a) El activo con la DL₅₀ más pequeña.
- b) El producto con la dosis máxima diaria más grande en unidades.
- c) El lote de menor tamaño en Kg o L.

Posteriormente se aplican las siguientes fórmulas.²⁸

1. Límite en el siguiente producto.

$$\mu\text{g de principio activo} / \text{mg o mL} = 0.001 * \text{DM} / \text{DMD} * \text{DP} \quad (\text{L1})$$

donde:

0.001 = factor de seguridad

DM = dosis mínima diaria del peor de los casos del grupo de productos (μg de principio activo)

DMD = dosis máxima diaria más grande del grupo de productos (en unidades de dosis)

DP = dosis en mL o peso unitario en mg

2. Límite por área superficial.

$$\mu\text{g} / \text{cm}^2 = \text{L1} * \text{TL} / \text{AS} \quad (\text{L2})$$

donde:

L1 = límite en el siguiente producto ($\mu\text{g}/\text{mg}$ o $\mu\text{g}/\text{mL}$)

TL = tamaño de lote más pequeño del grupo de productos (mg o mL)

AS = área de superficie del equipo en contacto con los productos (cm^2)

3. Límite en la muestra analizada, expresado en $\mu\text{g} / \text{mL}$ del activo:

$$\mu\text{g} / \text{g o mL (ppm)} = \text{L2} * \text{AM} / \text{D} \quad (\text{L3})$$

donde:

L2 = límite por área superficial

AM = área de muestreo con el hisopo (cm^2)

D = dilución de la muestra antes del análisis (mL)

4. Transformar las ppm de activo por muestreo a ppm de carbono por muestreo, considerando el contenido en por ciento de carbono del principio activo, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{ppm de carbono / muestreo} = L3 * CCF / 100$$

donde:

L3 = límite en la muestra analizada

CCF = Contenido de carbono en porciento del principio (elegido como el peor de los casos)

Utilizar el dato de 10 ppm como criterio de aceptación, si el límite calculado es mayor a 10 ppm de carbono.

MÉTODOS DE MUESTREO

Hay dos tipos generales de muestreo que se han encontrado aceptables. El más recomendable es el método directo de muestreo de la superficie del equipo. Otro es el uso de soluciones de enjuague.

a) Muestreo Directo de la Superficie.¹⁹

Este método implica el uso de hisopos impregnados con un solvente que permite remover los residuos de la superficie de los equipos adecuadamente. El hisopo en sí y el solvente no deben interferir en el análisis.

Las ventajas del muestreo directo es que las áreas más difíciles de limpiar durante el lavado de los equipos, pueden ser evaluadas, llevando a establecer un nivel de contaminación o de residuo por área de superficie. Además, los residuos que están "secos" o son insolubles pueden ser muestreados removiéndolos físicamente.

b) Muestras de enjuague.

La ventaja de usar muestras de enjuague es que puede ser muestreada y evaluada una mayor superficie y lugares inaccesibles o aquellos que no pueden ser desensamblados rutinariamente.

Una desventaja es que el residuo o contaminante puede no ser soluble o puede estar físicamente ocluido en el equipo.

- c) **Lote placebo**
Este método implica la elaboración de un lote placebo en los equipos bajo los mismos parámetros de operación utilizados en el producto.

Una muestra del lote placebo se analiza para detectar la contaminación residual, sin embargo se debe considerar que en caso de existir contaminación del activo, ésta no estará distribuida uniformemente en el lote placebo fabricado, siendo más probable el concentrado de este en la porción inicial de descarga del lote.

CAPÍTULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

OBJETIVOS:

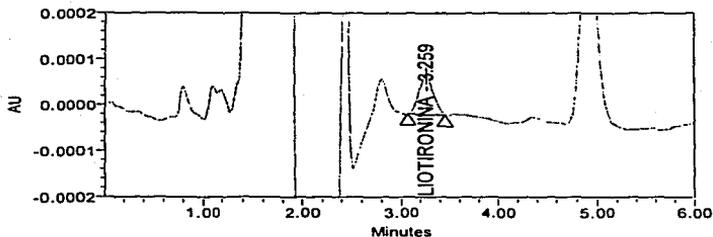
- Desarrollar y validar un método analítico con el cual se evalúe la limpieza de los equipos de fabricación utilizados en la fabricación de tabletas con liotironina, empleando la técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Se partió de un método analítico ya establecido utilizado en la cuantificación rutinaria de control de calidad y monitoreo de la estabilidad de tabletas con liotironina, al cual se le hicieron las modificaciones necesarias para cuantificar trazas del activo. Al aplicar el mismo método se observó que el frente del disolvente interfiere con la cuantificación de trazas de liotironina.

Condiciones iniciales:

Columna : Phenomenex Ultracarb 5 μ m ODS 250 X 4.6 mm
Fase móvil: H₂O : ACN + 1 mL H₃PO₄ por Litro
Proporción: 64 : 36
Flujo: 1.2 mL/min
Vol. inyección: 20 μ L
Long. de onda: 230 nm

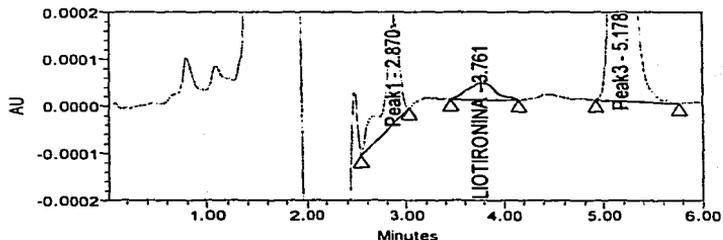


Cromatograma de solución de referencia. Condiciones iniciales.

Por lo anterior se decidió modificar la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil para aumentar la retención de la liotironina en la columna.

Condiciones finales:

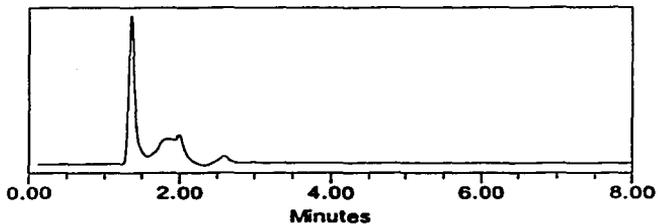
Columna : Phenomenex Ultracarb 5 μ m ODS 250 X 4.6 mm
 Fase móvil: H₂O : ACN + 1 mL H₃PO₄ por Litro
 Proporción: 65 : 35
 Flujo: 1.2 mL/min
 Vol. inyección: 20 μ L
 Long. de onda: 230 nm



Cromatograma de solución de referencia. Condiciones finales.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Durante la validación se trabajó únicamente con la liotironina debido a que ningún componente del "placebo", así como componentes de degradación de éste interfieren con la cuantificación de liotironina. No se presenta pico alguno que interfiera con la elución de la liotironina ($t_r \approx 3.8\text{min}$).



Cromatograma de solución placebo (15 días luz UV)

Una vez establecido el sistema para cuantificar la liotironina se procedió a establecer las condiciones de muestreo y extracción de las muestras, colocando cantidades conocidas de liotironina en diferentes condiciones. Los resultados fueron los siguientes:

Muestra	Adicionar alicuota a:	Tiempo de agitación	Núm. de hisopos utilizados.	% de recobro
a	vial directo	N.A.	s/h	98.88
b	hisopo	30 seg	---	102.88
c	hisopo	2 min	---	102.75
d	placa de acero	30 seg	1	83.73
e	placa de acero	2 min	1	86.79
f	placa de acero	30 seg	2	86.56
g	placa de acero	2 min	2	92.06

El % de recobro mínimo aceptable es de un 60.00%.²⁴ Sin embargo se buscó recobrar la mayor cantidad posible.

En base a estos resultados, se establecieron las siguientes condiciones para la validación del método:

Aplicar 150 µL de solución de la muestra en placas de acero inoxidable, dejar secar a temperatura ambiente y realizar el raspado de las placas con dos hisopos (ver anexo 1) previamente humedecidos con 150 µL de solución de dilución. Cortar la cabeza de los hisopos y colocarlos en los viales, adicionar 15 mL de solución de dilución para llevar a cabo la extracción de la muestra. Agitar durante dos minutos en vortex.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

A continuación se describe la forma en la que se llevó a cabo cada una de las etapas de la validación del método analítico.

Una vez que se acondiciona el sistema cromatográfico y por cada día de trabajo o etapa de validación se debe cumplir con la adecuabilidad del sistema, el cual consiste en: Realizar cuatro inyecciones de la solución de referencia 1 y tres de la solución de referencia 2. Calcular el coeficiente de variación y el factor de recobro.

Los criterios de aceptación son los siguientes: el coeficiente de variación (CV) menor al 2.00% y el factor de recobro (FR) entre 98.00 y 102.00%.

Ejemplo de adecuabilidad del sistema:

Pesos		
S ₁ =	10.9 mg	
S ₂ =	11.1 mg	
ÁREA STD 1	ÁREA STD 2	
448885	454067	
447445	454712	FR = 99.95 %
446550	457895	
445575		
<u>447114</u>	<u>455558</u>	
0.31	0.45	

$$FR = \frac{\bar{X} \text{ Área } S_1}{\bar{X} \text{ Área } S_2} \times \frac{\text{Peso } S_1}{\text{Peso } S_2} \times 100$$

Linealidad de sistema.

Construir una curva de concentración de la sustancia de interés contra respuesta obtenida. Considerar la concentración del 100% como 8 µg/mL de liotironina en la solución final a analizar.

Trabajar con niveles de 50, 75, 100, 125 y 150%, a partir del considerado como 100%. Obtener las respuestas de tres muestras independientes por cada nivel.

Obtener las diferentes concentraciones a partir de una misma solución stock. Graficar respuesta contra concentración.

Calcular el factor de respuesta (concentración/respuesta), para cada punto.

Precisión del sistema.

Obtener la respuesta por sextuplicado, de una misma solución de la sustancia de referencia de interés, correspondiente al 100% de la linealidad del sistema.

Cantidad mínima detectable.

Determinar la cantidad mínima detectable a partir de diferentes concentraciones de la sustancia de interés de manera descendente. Inyectar la solución por triplicado de cada nivel de concentración.

Determinar la relación señal/ruido para cada inyección.

Cantidad mínima cuantificable.

Analizar tres cantidades diferentes de principio activo de manera independiente. Preparar las soluciones a adicionar a partir de una solución stock.

Las concentraciones deben proporcionar una respuesta adecuada.

Determinar la relación señal/ruido para cada inyección.

Linealidad del método.

Analizar siete cantidades diferentes de principio activo de manera independiente, de tal forma que se evalúen los criterios de aceptación, así como niveles cercanos a límite de cuantificación.

Las concentraciones que se obtengan en las muestras deben ser de preferencia las que se utilizaron para el sistema. Debe incluir el 100%. Analizar tres muestras independientes por cada nivel, empleando el método propuesto.

Graficar cantidad recuperada contra cantidad adicionada.

Exactitud del método al 100%.

Analizar seis muestras independientes, utilizando el método propuesto. Los seis análisis deben ser llevados a cabo por el mismo analista, en las mismas condiciones.

Reproducibilidad.

Analizar una muestra homogénea por triplicado cada una por dos analistas en dos días diferentes. Preparar soluciones estándar independientes por analista y por día de análisis.

Estabilidad de la muestra analítica y solución de referencia.

Analizar la solución de la muestra por triplicado y la solución de referencia por duplicado. Almacenar por 24 h protegidas de la luz.

Inyectar nuevamente las muestras y estándares anteriores cuando han transcurrido las 24 h. Utilizar soluciones de la sustancia de referencia recién preparadas.

Tolerancia.

Analizar una muestra por triplicado en condiciones normales de análisis, agua:acetonitrilo (65:35); cambiar la proporción de disolvente en fase móvil, ya que es considerado un parámetro crítico en el análisis. Condición 1 agua:acetonitrilo (63:37) y condición 2 agua:acetonitrilo (67:33).

Especificidad.

Analizar muestras degradadas. Condiciones de degradación: acidez, alcalinidad, oxidación, luz UV y temperatura de 60°C.

Verificar con un detector de arreglo de diodos que el pico correspondiente a la liotironina es puro.

REACTIVOS:

Agua grado HPLC
Acetonitrilo grado HPLC Burdick & Jackson
Ácido fosfórico R.A., J.T. Baker
Hidróxido de sodio R.A., J.T. Baker
Metanol R.A., Tecsiquim
Liotironina sódica sustancia de referencia interna de trabajo

MATERIAL Y EQUIPO:

Material de vidrio
Placas de acero inoxidable (50cm²)
Hisopos de poliéster
Microjeringa 250µL
Micropipeta 100-1000µL
Balanza analítica
Sistema de microfiltración:
 Membrana de nylon de 47 mm, 0.45 µm de tamaño de poro
 Acrodiscos Gelman GHP de 25 mm, 0.45 µm de tamaño de poro
Columna: Phenomenex Ultracarb 5 µm ODS 250 X 4.6 mm
Cromatógrafo de líquidos Waters equipado con:
 Bomba Waters modelo 515
 Automuestreador Waters modelo 717 plus
 Detector Waters 2487 onda variable
 Degasificador Metachem 6324
 Módulo controlador de bomba
 Monitor Dell Trinitron P780

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES:

Fase móvil. Adicionar 1mL de ácido fosfórico a 650 partes de agua y agitar magnéticamente, adicionar 350 mL de acetonitrilo. Filtrar a través de membrana de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro al vacío y mantener la agitación. Desgasificar durante 10 minutos.

Solución de dilución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico (solución de dilución). En 500 mL de agua disolver 400 mg de hidróxido de sodio; dejar enfriar y adicionar 500 mL de metanol, mezclar.

Preparación de la solución de referencia. Pesar aproximadamente 10 mg de sustancia de referencia de liotironina y llevar a un matraz volumétrico de 100 mL, disolver con la solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico, llevar a volumen con la misma solución. Agitar y tomar una alícuota de 4.0 mL y llevarla a un matraz volumétrico de 50 mL, llevar a volumen con solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico y agitar. La concentración de liotironina es aproximadamente de 8 µg/mL.

Preparación de la muestra analítica. Pesar aproximadamente 21.7 mg de liotironina sódica materia prima y llevar a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver y llevar a volumen con solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico y mezclar. Colocar 150 µL de dicha solución en una placa de acero inoxidable de 50 cm². Dejar secar a temperatura ambiente y protegida de la luz. Realizar el raspado de las placas con los hisopos humedecidos previamente con 150 µL de solución de dilución y adicionar 15 mL de solución 0.01 M de hidróxido de sodio metanólico para llevar a cabo la extracción de la muestra. Agitar durante dos minutos.

Procedimiento

Condiciones Cromatográficas

Columna: Phenomenex Ultracarb 5 µm ODS 250 X 4.6 mm

Fase móvil: Agua:Acetonitrilo 65:35, con 1 mL de ácido fosfórico por litro de solución.

Flujo: 1.2 mL/min

Volumen de inyección: 20 µL

Longitud de onda: 230 nm

Temperatura: ambiente

Acondicionar el sistema cromatográfico durante 60 minutos o hasta obtener una línea base estable. Cumplir con los parámetros de adecuabilidad establecidos.

Cálculos

Calcular el porcentaje de liotironina recuperada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ recuperado} = \frac{A_m \times P_{std} \times FV_{std} \times 4 \times 651.0 \times 25 \times 15 \times 1000 \times 100}{A_{std} \times 100 \times 50 \times 673.0 \times P_{mtra} \times 150}$$

Donde:

- A_m = Área de la solución muestra
- A_{std} = Área promedio de las soluciones patrón de referencia
- P_{std} = Peso promedio de la sustancia de referencia (mg)
- P_{mtra} = Peso de la muestra (mg)
- FV_{std} = Factor de valoración de la sustancia de referencia (%/100)
- 651.0 = Masa molecular de liotironina
- 673.0 = Masa molecular de liotironina sódica
- 4.0 = Alícuota solución patrón de referencia
- 100 y 50 = Aforos solución patrón de referencia
- 1000 = Factor de conversión de μL a mL
- 150 = Volumen adicionado a la placa (μL)

RESULTADOS:

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA: LINEARIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

PESO DEL STOCK
S = 10.5 mg

ESTANDAR : LIOTIRONINA SÓDICA
LOTE : 0006000199

VALORACIÓN: 95.50 %
FACTOR: 0.9550

DILUCIONES
PM (mg) → 100
 → 50
X → 50

$$\text{Conc (}\mu\text{g/mL)} = \frac{10.5}{100} \times \frac{\text{Alicuota}}{50} \times 0.9550 \times 1000 \times \frac{651.0}{673.0}$$

LINEARIDAD DEL SISTEMA

			PRUEBA (mg)	FACTOR CONC/REA (µg)
50	2	3.88	205931	1.88
		3.88	205250	1.89
		3.88	205170	1.89
75	3	5.82	307286	1.89
		5.82	307153	1.89
		5.82	308910	1.88
100	4	7.76	409350	1.90
		7.76	409570	1.89
		7.76	407174	1.91
125	5	9.70	511880	1.89
		9.70	511605	1.90
		9.70	511918	1.89
150	6	11.64	614128	1.90
		11.64	616006	1.89
		11.64	615149	1.89

C.V.= 0.41%

r² = 1.0000

Criterios de aceptación: C.V. menor o igual a 1.50 %

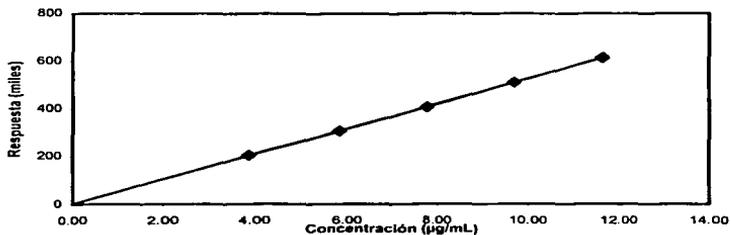
r² mayor o igual a 0.9800

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA: LINEARIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

LINEARIDAD DEL SISTEMA PARA LIOTIRONINA



Precisión del sistema

CONCENTRACIÓN: 7.76 µg/mL

RESPUESTA
409350
409570
407174
407919
408353
408683

Criterio de aceptación:

C.V. menor o igual a 1.50 %

\bar{x} = 408508

C.V. = 0.22 %

El sistema es lineal y exacto en un intervalo de 3.88 a 11.64 µg/mL de liotironina.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA : LÍMITE DE DETECCIÓN

PESO DEL STOCK
S = 10.5 mg

ESTANDAR : LIOTIRONINA SÓDICA
LOTE : 0006000199

VALORACIÓN: 95,50 %
FACTOR: 0,9550

DILUCIONES

PM (mg) → 100
 2 → 50
 5 → 25
 5* → 25
 allicuota* → 50

$$\text{Conc (}\mu\text{g/mL)} = \frac{10.5}{100} \times \frac{2}{50} \times \frac{5}{25} \times \frac{5}{25} \times 0.9550 \times \frac{651.0}{673.0} \times \frac{\text{Allicuota}^*}{50} \times 1000$$

N.º (REP)	ALICUOTA (μL)	CONCENTRACION (μg/mL)	MD (μg)	MD (μg)	ESCONDIDA	
M1-1	1	6.21	2.5	1.4	1.5	X̄ = 1.67 C.V. = 13.83
M1-2		6.21	2.5	1.4	1.8	
M1-3		6.21	2.7	2.0	1.4	
M2-1	2	12.42	4.2	1.3	3.2	X̄ = 3.37 C.V. = 6.18
M2-2		12.42	4.0	1.1	3.6	
M2-3		12.42	4.3	1.3	3.3	
M3-1	3	18.62	7.1	1.4	5.1	X̄ = 5.10 C.V. = 0.00
M3-2		18.62	7.1	1.4	5.1	
M3-3		18.62	7.1	1.4	5.1	

El límite de detección se determinó por el método gráfico.

Criterios de aceptación:

La cantidad mínima detectable es aquella que su promedio de la relación señal/ruido sea mayor o igual a 3.

El límite de detección obtenido es 0.0124 μg/mL de liotironina.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA : LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

PESO DEL STOCK
S = 10.9 mg

ESTANDAR : LIOTIRONINA SÓDICA
LOTE : 0006000199

VALORACIÓN: 95.50 %
FACTOR: 0.9550

DILUCIONES

PM (mg) → 100
2 → 50
5 → 25
20 → 50
alícuota → 25

$$\text{Conc } (\mu\text{g/mL}) = \frac{10.9}{100} \times \frac{2}{50} \times \frac{5}{25} \times \frac{20}{50} \times 0.9550 \times \frac{651.0}{673.0}$$

$$\times \frac{\text{Alícuota}^*}{25} \times 1000$$

M1-1	4	51.80	5.9	0.9	6.56	X̄ = 7.32 C.V. = 23.56
M1-2		51.60	6.1	1.0	6.10	
M1-3		51.60	6.5	0.7	9.29	
M2-1	5	64.40	7.2	0.7	10.29	X̄ = 10.34 C.V. = 0.78
M2-2		64.40	7.2	0.7	10.29	
M2-3		64.40	7.3	0.7	10.43	
M3-1	8	77.20	8.4	0.7	12.00	X̄ = 13.45 C.V. = 9.31
M3-2		77.20	8.5	0.6	14.17	
M3-3		77.20	8.5	0.6	14.17	

El límite de cuantificación se determinó por el método gráfico.

Criterios de aceptación:

La cantidad mínima cuantificable es aquella que su promedio de la relación señal/ruido sea mayor o igual a 10.

El límite de cuantificación obtenido es 0.0644 µg/mL de liotironina.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA: LINEARIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

CANTIDAD ADICIONAL (µg)	CONCENTRACION (µg/ml)	AREA	TIEMPO (min)	RECUPERACION (%)	
10.07	0.67	38393	9.92	98.51	
10.07	0.67	38258	9.88	98.11	$\bar{X} = 100.33$
10.07	0.67	40690	10.51	104.37	C.V. = 3.49
15.10	1.01	57987	14.98	99.21	
15.10	1.01	55865	14.43	95.56	$\bar{X} = 97.51$
15.10	1.01	57127	14.76	97.75	C.V. = 1.88
55.87	3.72	212261	55.15	104.08	
55.87	3.72	210793	57.75	103.36	$\bar{X} = 103.58$
55.87	3.72	210651	57.71	103.29	C.V. = 0.42
87.80	5.85	309498	84.79	96.57	
87.80	5.85	297986	81.64	92.98	$\bar{X} = 96.19$
87.80	5.85	317353	86.94	99.02	C.V. = 3.16
119.72	7.98	396513	108.66	90.76	
119.72	7.98	417099	114.27	95.45	$\bar{X} = 93.04$
119.72	7.98	405971	111.22	92.90	C.V. = 2.52
151.65	10.11	500447	137.11	90.41	
151.65	10.11	482864	132.29	87.23	$\bar{X} = 90.21$
151.65	10.11	514794	141.04	93.00	C.V. = 3.20
183.57	12.24	605724	185.95	90.40	
183.57	12.24	596994	163.56	89.10	$\bar{X} = 90.64$
183.57	12.24	619239	169.65	92.42	C.V. = 1.85

Crterios de aceptaci3n

\bar{X} entre 90.00 -110.00 %

$\bar{X} = 95.93$

C.V. menor o igual a 6.00 % para cada nivel

C.V. = 5.38

y de todo el intervalo

r^2 mayor o igual a 0.9800

$r^2 = 0.9966$

m aproximadamente 1

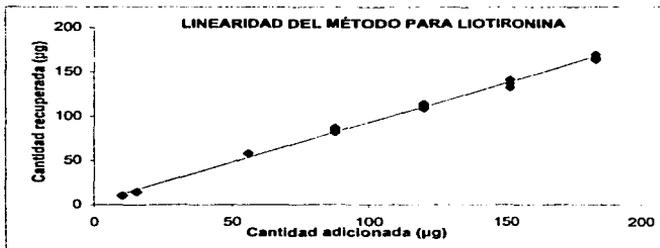
m = 0.8931

b aproximadamente 0

b = 3.5172

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA: LINEARIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO



EXACTITUD DEL MÉTODO

NIVEL	CANTIDAD	CONCENTRACION	S	CANTIDAD	RECUPERADO	
100-1	119.72	7.98	396613	108.66	90.76	
100-2	119.72	7.98	417099	114.27	95.45	
100-3	119.72	7.98	405971	111.22	92.90	
100-4	119.72	7.98	406027	111.24	92.92	
100-5	119.72	7.98	404779	110.90	92.63	
100-6	119.72	7.98	395026	180.22	90.39	
						$\bar{X} = 92.51$ C.V. = 1.97

Criterio de aceptación

\bar{X} entre 90.00 - 110.00 %

C.V. menor o igual a 6.00 %

El método es lineal en un intervalo de 0.67 - 12.24 µg/mL de liotironina

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA : REPRODUCIBILIDAD

La cantidad adicionada es de 120.28 µg.

La concentración final es de 8.02 µg/mL.

		Analista
	92.28 91.57 91.2	86.59 91.22 96.26
	97.12 99.68 98.03	92.17 93.09 93.82
	94.98	92.19
	3.92	3.51
	93.59	
	3.88	

Criterios de aceptación : C.V. por analista y el total de análisis menor o igual a 6.00 % *

El método es reproducible por dos analistas en días diferentes.

* Nota: Se está considerando un Coeficiente de Variación de 6.00 % y no de 2.00 % como lo es para un método cromatográfico, debido a la alta variación que representa el raspado de superficie para obtención de la muestra analítica.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA : ESTABILIDAD DE ESTÁNDAR Y MUESTRA EN SOLUCIÓN

La cantidad adicionada es de 120.28 μg .

La concentración final es de 8.02 $\mu\text{g/mL}$.

Muestras en solución

1	92.43	92.78
2	93.44	93.79
3	92.41	92.76
\bar{x} =	92.78	93.11
C.V. =	0.63	0.63
I_1		100.38
I_2		100.37
I_3		100.38
\bar{x} =		100.38
C.V. =		0.01

Estándares en solución

1	101.15	98.66
2	98.86	98.28
\bar{x} =	100.01	98.47
C.V. =	1.62	0.27
I_1		97.54
I_2		99.41
\bar{x} =		98.48
C.V. =		1.34

Criterio de aceptación : El valor promedio de I debe estar entre 98.00-102.00 % .

La muestra y estándares en solución son estables por un periodo de 24 horas.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC

ETAPA : TOLERANCIA

CONDICIÓN	EFICIENCIA	TIEMPO DE RETENCIÓN	RESOLUCIÓN	COEF. DE CORRELACIÓN	RECORSO (%)
Agua:Acetonitrilo (63 : 37)	1921	3.03	1.3	1.1	92.13
Agua:Acetonitrilo (65 : 35)	1789	3.85	3.3	1.1	94.52
Agua:Acetonitrilo (67 : 33)	1960	5.14	6.1	1.1	94.41

Criterio de aceptación:

La diferencia de los resultados debe ser menor o igual a 2.00 %

El método es tolerante únicamente al utilizar fases móviles con proporciones de agua:acetonitrilo de 65 : 35 a 67 : 33.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR HPLC**ETAPA : ESPECIFICIDAD**

Medio	Ángulo de pureza	Umbral de pureza	Umbral de especificidad
Medio Acido HCl 0.1N 0.5 mL, 60 °C, 15 min	97.13	0.302	1.926
Medio Básico NaOH 0.1N 0.5 mL, 60 °C, 15 min	93.53	0.297	2.004
Medio Básico NaOH 0.1N 0.5 mL, 60 °C, 50 min	90.00	0.445	2.955
Medio Oxidativo H ₂ O ₂ 30 % 0.5 mL, 60 °C, 15 min	87.06	0.306	2.115
Medio Oxidativo H ₂ O ₂ 30 % 0.5 mL, 60 °C, 50 min	82.88	0.769	3.858
Luz UV 15 días	85.74	0.279	2.013
Temperatura 60 °C, 15 días	87.81	0.282	2.051

Criterio de aceptación:

El ángulo de pureza es menor al umbral de pureza.

El método es específico.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CONCLUSIONES :

1. El sistema es lineal en un intervalo de concentración de 3.88 a 11.64 $\mu\text{g/mL}$, con un C.V. en todo el intervalo de 0.41% y una r^2 de 1.000, y preciso en una concentración de 7.76 $\mu\text{g/mL}$ con un C.V. de 0.22%.
2. El método es lineal en un intervalo aproximado de 10.07 a 183.57 μg , (0.67 a 12.24 $\mu\text{g/mL}$ de concentración final), con un C.V. total de 5.38 % y una r^2 de 0.9966. Los C.V. para cada nivel son menores al límite del criterio de aceptación.
3. El método es exacto para una cantidad aproximada de 119.72 μg , correspondiente al 100% (concentración final 7.98 $\mu\text{g/mL}$), con una media del por ciento recuperado de 92.15% y un C.V. de 1.97%.
4. El método resultó reproducible. El C.V. total de doce análisis de dos analistas en dos corridas diferentes fue de 3.88%.
5. Las soluciones de referencia y de muestra listas para el análisis son estables cuando menos por un período de 24 h a temperatura ambiente, protegidas de la luz.
6. El sistema es tolerante al cambiar la fase móvil de una proporción Agua : Acetonitrilo 65 : 35 a 67 : 33 . No es tolerante si se aumenta la proporción de acetonitrilo arriba de 35%.
7. La cantidad mínima detectable de liotironina es de 0.31 μg (0.0124 $\mu\text{g/mL}$) con un C.V. de 0.06%.
8. La cantidad mínima cuantificable de liotironina es 1.61 μg (0.0644 $\mu\text{g/mL}$) con un C.V. de 1.94%.
9. El método es específico ya que los productos de degradación no interfieren en la cuantificación de liotironina.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR INFRARROJO.

OBJETIVO:

- Determinar si la técnica de espectroscopía de infrarrojo puede ser utilizada en la evaluación de limpieza de los equipos empleados en la fabricación de tabletas de liotironina, mediante el uso de un espectrofotómetro de infrarrojo con transformadas de Fourier.

DESARROLLO DEL MÉTODO.

En base a la información bibliográfica con la que se contaba y a las características que presenta la molécula de liotironina en cuanto a polaridad se realizaron algunas pruebas de solubilidad de tal forma que se pudiese emplear un diluyente que solubilizara la liotironina y que no interfiriera con su cuantificación.

Las pruebas de solubilidad se realizaron en disolventes orgánicos tales como: cloroformo, tetracloruro de carbono, hexano, tolueno, acetonitrilo, etanol y metanol. De los cuales en los 2 últimos fué donde se solubilizó la liotironina.

Para verificar que era reproducible la cantidad de liotironina disuelta se recurrió a la técnica de HPLC utilizando el sistema cromatográfico ya mencionado, preparando tres muestras independientes con metanol, ya que en comparación con el etanol, el primero presenta menor cantidad de impurezas que pudiesen afectar en el análisis.

Una vez que se determinó el disolvente a emplear se prepararon muestras con diferentes concentraciones partiendo de los criterios de aceptación y quedando un intervalo de 50 a 150% para realizar la curva de calibración.

Las condiciones iniciales con que se realizó la curva de calibración fueron:

Fuente:	Láser de dióxido de carbono IR medio
Detector:	DTGS IR medio
Divisor:	KBr
Resolución:	4 cm^{-1}
OPD:	0.5 cm/seg
No. de barridos:	16
Accesorio para la muestra:	ATR acanalado

Como no se obtuvo una respuesta satisfactoria al leer las muestras conocidas como muestras "problema" en el equipo de infrarrojo con respecto a la curva de calibración se procedió a realizar algunos cambios.

Los cambios realizados se mencionan a continuación:

- | | | |
|------|----------------------------|--|
| I. | Fuente: | Láser de dióxido de carbono IR medio |
| | Detector: | DTGS IR medio |
| | Divisor: | KBr |
| | Resolución: | 6 cm^{-1} |
| | OPD: | 0.1 cm/seg |
| | No. de barridos: | 35 |
| | Accesorio para la muestra: | ATR acanalado |
| II. | Fuente | Láser de dióxido de carbono IR cercano |
| | Detector: | DTGS IR cercano |
| | Divisor: | KBr |
| | Resolución: | 6 cm^{-1} |
| | OPD: | 0.1 cm/seg |
| | No. de barridos: | 35 |
| | Accesorio para la muestra: | ATR acanalado y celda cilíndrica |
| III. | Fuente | Láser de dióxido de carbono IR cercano |
| | Detector: | DTGS IR cercano |
| | Divisor: | Cuarzo |
| | Resolución: | 6 cm^{-1} |
| | OPD: | 0.1 cm/seg |
| | No. de barridos: | 35 |
| | Accesorio para la muestra: | celda de cuarzo |

Además de los cambios ya mencionados se realizaron pruebas con: Accesorio de esfera de integración, en el cual solamente se puede trabajar en infrarrojo cercano y con muestras sólidas. Para tal efecto no hay forma de obtener muestras sólidas para evaluar la limpieza de los equipos de fabricación. Celdas cilíndricas de vidrio, la interferencia provocada por el material de fabricación de dichas celdas no permitió llevar a cabo el análisis.

En cada uno de los anteriores se verificó la reproducibilidad del sistema obteniendo resultados no satisfactorios.

Así mismo no solo se realizaron cambios en lo que corresponde a la forma de analizar la muestra sino también en cuanto al tratamiento de los datos y del uso del Software "Quant +".

El método no es específico en la cuantificación de liotironina.

Se buscó emplear la técnica aunque fuese de forma inespecífica y para ello se utilizó el producto terminado y el "placebo" para realizar nuevas pruebas, pero no fué posible tener una reproducibilidad en el método.

Conclusiones.

Por las características de polaridad que presenta la liotironina no fue posible emplear un disolvente que permitiera obtener linealidad en la curva de calibración y reproducibilidad en las muestras conocidas. Debido a que:

- Los disolventes empleados absorben en el infrarrojo.
- La esfera de integración únicamente se emplea para analizar muestras sólidas.
- El material de fabricación de las celdas cilíndricas absorben en el infrarrojo.

Por consiguiente la espectroscopía de infrarrojo en las condiciones trabajadas no puede emplearse para la evaluación de la limpieza de los equipos empleados en la fabricación de tabletas de liotironina.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC.

OBJETIVOS:

- Desarrollar y validar un método analítico con el cual se evalúe la limpieza de los equipos de fabricación utilizados en la fabricación de tabletas con liotironina, empleando la técnica de Carbono Orgánico Total, determinando carbono orgánico no purgable.

DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

El desarrollo del método analítico se inició verificando la solubilidad del producto (tabletas de liotironina) en agua y en solución de hidróxido de sodio 0.01 M, teniendo como antecedente la solución de dilución empleada en el análisis de HPLC, pero sin la adición del metanol debido a que por experiencias anteriores en el laboratorio, el uso de alcoholes aún cuando se evaporen proporciona mucha variación en los resultados.

A continuación se presenta el % de recobro obtenido al solubilizar tabletas de liotironina en agua y solución de hidróxido de sodio 0.01 M, llevando a cabo el siguiente tratamiento:

1. Adicionar agua o solución de NaOH 0.01 M
2. Someter a agitación magnética durante 2 minutos.
3. Filtrar por papel Whatman No. 42. Preparar tres muestras por cada condición.

Muestra	% Recuperado (agua)	% Recuperado (NaOH 0.01 M)
M1	27.47	17.58
M2	31.87	18.05
M3	28.87	25.13
Promedio	29.40	20.25

Por lo anterior, se determinó utilizar únicamente agua con bajo contenido de carbono debido a que hay mayor cantidad de producto disuelto.

Una vez establecido en que se solubilizaría el producto se procedió a establecer las condiciones de muestreo, extracción y tiempo de burbujeo de las muestras, colocando cantidades conocidas del producto en diferentes condiciones. Los resultados fueron los siguientes:

Muestra	Adicionar alícuota a:	Tiempo de agitación	Tiempo de burbujeo	% de recobro
a	hisopo	2 min	4 min	30.03
b	hisopo	2 min	2 min	29.50

Por los resultados anteriores se decidió como tiempo de agitación 2 minutos en vórtex y 2 minutos como tiempo de burbujeo en el analizador TOC.

Los resultados obtenidos para determinar el número de hisopos son los siguientes:

Muestra	Tiempo de agitación	Tiempo de burbujeo	Núm. de hisopos	% de recobro
a	2 min	2 min	2	31.02
b	2 min	2 min	3	25.75

El % recuperado es bajo, ya que los excipientes que contribuyen con cantidades de carbono son parcialmente solubles en agua²⁶ y el activo no lo es.

En base a los resultados obtenidos las condiciones en que se llevará a cabo el tratamiento de la muestra es: Utilizar 2 hisopos para el raspado de las placas, tiempo de agitación 2 minutos y tiempo de burbujeo 2 minutos.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

A continuación se describe la forma en la que se llevó a cabo cada una de las etapas de la validación del método.

Linealidad del sistema

Construir una curva de concentración de sacarosa contra respuesta obtenida, considerar un intervalo de 0 a 20 ppm de carbono.

Obtener las diferentes concentraciones a partir de una misma solución stock.

Graficar respuesta en ppm de carbono contra concentración.

Precisión del sistema

Obtener la respuesta por sextuplicado, de una misma solución de sacarosa. Obtener promedio y coeficiente de variación.

Adecuabilidad del sistema

Evaluar dos soluciones de 500 ppb de carbono, una de sacarosa y otra de 1,4-benzoquinona. Adicionar una solución blanco para analizar y aplicar la siguiente fórmula

$$\% \text{ de eficiencia} = \frac{EB - BA}{ES - BA} * 100$$

donde:

- EB = Solución de 1,4-benzoquinona
- ES = Solución de sacarosa
- BA = Solución blanco

El sistema cumple con la adecuabilidad si la eficiencia de oxidación es no menor a 85% y no mayor del 115% de la respuesta de la 1,4-benzoquinona con respecto a la respuesta de la sacarosa.

Linealidad del método

Analizar 4 concentraciones diferentes de ppm de carbono. Las concentraciones deben obtenerse de una solución stock. Incluir el 100%. Analizar tres muestras independientes por cada nivel, utilizando el método propuesto.

Graficar cantidad adicionada contra cantidad recuperada.

Exactitud del método

Analizar seis muestras independientes, utilizando el método propuesto.

Los seis análisis deben ser llevados a cabo por el mismo analista, en las mismas condiciones.

Reproducibilidad

Analizar una muestra homogénea por triplicado cada una, por dos analistas en dos días diferentes.

Estabilidad de la muestra en solución

Analizar la solución de la muestra por triplicado a tres diferentes tiempos, iniciando con tiempo inicial (cero horas), primer tiempo (4 horas) y segundo tiempo (8 horas).

REACTIVOS:

Agua con bajo contenido de carbono
Ácido clorhídrico R.A., J.T. Baker

MATERIAL Y EQUIPO:

Material de vidrio
Placas de acero inoxidable (50 cm²)
Hisopos de poliéster
Microjeringa 250 µL
Micropipeta de 100-1000 µL
Balanza analítica
Vortex maxi mix I Thermolyne
Papel Whatman No. 42
Analizador TOC - VCPH
Procesador DELL Optiplex 6X1
Monitor SPECTRUM Vn
Generador de gas TOC

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución 2N de ácido clorhídrico:

Transferir 17 mL de ácido clorhídrico a un matraz volumétrico de 100 mL, mezclar y llevar a volumen con agua con bajo contenido de carbono *.

Solución patrón (601.65 ppm de carbono)

Moler 100 tabletas de liotironina en un mortero y pesar aproximadamente 700 mg de del polvo (contenido de carbono 85950 µg de carbono / g de producto **). Transferir a un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 50 mL de agua, agitar y sonicar durante 10 minutos, llevar a volumen con agua y filtrar por papel Whatman No. 42.

* Nota: de aquí en adelante solo se hará mención del agua, sabiendo de antemano que nos referimos al agua con bajo contenido de carbono.

** Nota: Este calculo es determinado con las cantidades de carbono que aporta cada uno de los excipientes en la fabricación de las tabletas de liotironina.

Preparación de la muestra analítica:

En base a los resultados obtenidos en el desarrollo del método, se establecieron las siguientes condiciones : Aplicar 300 µL de la solución patrón en placas de acero inoxidable , dejar secar a temperatura ambiente y realizar el raspado de las placas con dos hisopos previamente humedecidos con 150 µL con agua con bajo contenido de carbono. Cortar la cabeza de los hisopos y colocarlos en los viales, adicionar 30 mL de agua con bajo contenido de carbono para llevar a cabo la extracción de la muestra. Agitar durante dos minutos en vortex. Retirar la cabeza de los hisopos de los viales y adicionar 100 µL de solución 2N de ácido clorhídrico. Someter las muestras a 2 minutos de burbujeo con aire de alta pureza y analizar.

PROCEDIMIENTO:

Verificar que la curva de calibración se encuentre vigente al igual que la adecuabilidad del sistema. Posterior a esto se pueden analizar las muestras con su respectiva solución "blanco".

CÁLCULOS:

$$\text{ppm C adicionado} = \frac{\text{Pmtra} \times 85950 \times 0.300}{100 \times 30}$$

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Muestra} \times 100}{\text{Cantidad adicionada}}$$

RESULTADOS:

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC

ETAPA : LINEARIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA

PESO DEL ESTÁNDAR

S = 15.0 mg

DILUCIONES

PM (mg) → 250

Alicuota → Aforo

ESTÁNDAR : Sacarosa USP

LOTE : G1

VALORACIÓN : 100.00 %

Contenido de carbono: 0.4210 mg de C / mg de sacarosa.

FÓRMULA

$$\text{Concentración (}\mu\text{g de C / mL)} = \frac{15.0}{250} \times \frac{\text{Alicuota}^*}{\text{Aforo}} \times 0.4210 \times 1000$$

N/A	N/A	0.00	14.64
2	100	0.51	26.87
4	100	1.01	43.10
12	50	6.06	204.10
20	50	10.10	338.10
20	25	20.21	653.30

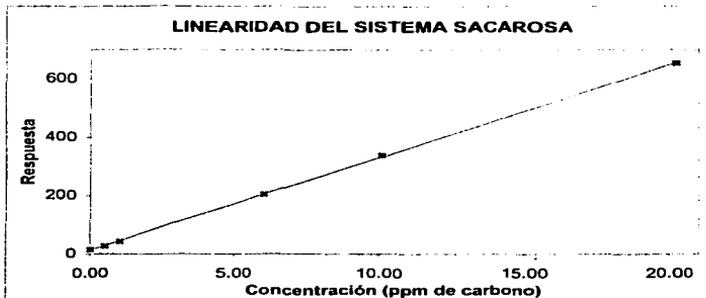
$$r^2 = 0.9999$$

Criterios de aceptación: r^2 mayor o igual a 0.9800

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC

ETAPA : LINEARIDAD Y PRECISIÓN DEL SISTEMA



Precisión del sistema

CONCENTRACIÓN: 6.00 ppm C

RESPOSTAS
208
208
209
209
209
209

Criterio de aceptación:

C.V. menor o igual a 10,00 %

\bar{X} = 209

C.V. = 0.25 %

El sistema es lineal en un intervalo de 0 a 20.21 ppm de carbono y preciso a una concentración de 6.00 ppm de carbono.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC

ETAPA : LINEARIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO

CANTIDAD DE MUESTRA	REPLICAS	CONCENTRACION DE ESTANDAR	CONCENTRACION DE MUESTRA	CONCENTRACION DE ESTANDAR	CONCENTRACION DE MUESTRA	CONCENTRACION DE ESTANDAR
90.25	30	3.01	0.85	28.24		
90.25	30	3.01	0.87	28.80		
90.25	30	3.01	0.79	26.25	27.80	5.07
180.50	30	6.02	1.80	29.90		
180.50	30	6.02	1.71	28.41		
180.50	30	6.02	1.75	29.07	29.13	2.56
270.74	30	9.02	2.82	31.23		
270.74	30	9.02	2.78	30.80		
270.74	30	9.02	3.06	33.89	31.97	5.25
360.99	30	12.03	4.12	34.22		
360.99	30	12.03	4.10	34.05		
360.99	30	12.03	4.18	34.72	34.33	1.01

Criterio de aceptación:

$$\bar{X} = 30.81$$

C.V. menor o igual a 10.00 %

$$C.V. = 9.17$$

EXACTITUD DEL MÉTODO

MUESTRA	CONCENTRACION DE ESTANDAR	CONCENTRACION DE MUESTRA	CONCENTRACION DE ESTANDAR	CONCENTRACION DE MUESTRA
M-1	6.02	1.80	29.90	
M-2	6.02	1.71	28.41	
M-3	6.02	1.75	29.07	
M-4	6.02	1.78	29.57	
M-5	6.02	1.87	31.06	$\bar{X} = 29.46$
M-6	6.02	1.73	28.74	C.V. = 3.23

Criterio de aceptación :

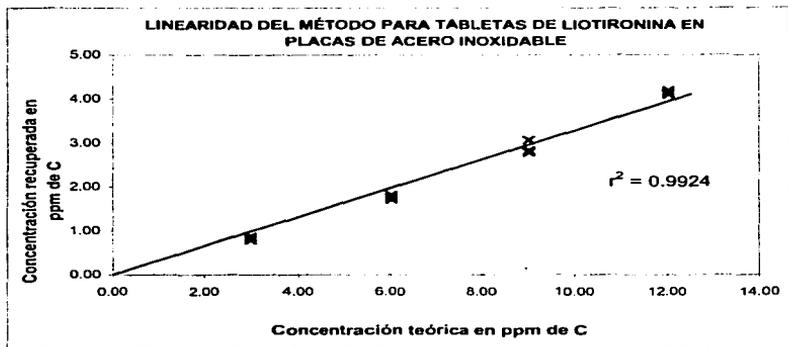
El C.V. debe ser menor o igual a 10.00 % para las seis determinaciones.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC

ETAPA : LINEARIDAD Y EXACTITUD DEL MÉTODO



El método es lineal en un intervalo de 3.01 a 12.03 ppm de carbono.

El método es exacto en una concentración de 6.02 ppm de carbono.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC

ETAPA : REPRODUCIBILIDAD

CONCENTRACIÓN: 6.02 ppm de carbono

	Analista 1	Analista 2
	26.91	28.90
	23.42	28.07
	25.58	25.58
	23.42	25.91
	25.75	29.24
	27.41	28.57
	25.42	27.71
	6.66	5.68
	26.56	
	7.40	

Criterios de aceptación : C.V. por analista y el total debe ser menor o igual a 10.00% .

El método es reproducible por dos analistas en días diferentes.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO POR TOC

ETAPA : ESTABILIDAD DE LA MUESTRA EN SOLUCIÓN

CONCENTRACIÓN: 6.01 ppm de carbono

	PORCENTAJE DE CORROSIÓN (%)	TIEMPO (HORAS)	PORCENTAJE DE CORROSIÓN (HORAS)
1	38.44	37.70	38.94
2	37.10	38.10	38.44
3	37.77	38.77	39.27
\bar{X} =	37.77	38.19	38.88
C.V. =	1.77	1.42	1.07
I_1		98.07	101.30
I_2		102.70	103.61
I_3		102.65	103.97
\bar{X} =		101.14	102.96
C.V. =		2.63	1.41

Criterio de aceptación :

El valor promedio de I debe estar entre 94.00-106.00 %

El C.V. por tiempo debe ser menor o igual a 10.00 %.

La muestra en solución es estable por lo menos en un período de 8 horas.

CONCLUSIONES:

1. El sistema es lineal en un intervalo de concentración de 0 a 20.21 ppm de carbono y una r^2 de 0.9999, y preciso en una concentración de 6.00 ppm de carbono con un C.V. de 0.25%.
2. El método es lineal en un intervalo aproximado de 3.01 a 12.03 ppm de carbono con un C.V. total de 9.17% y una r^2 de 0.9924. Los C.V. para cada nivel son menores al límite del criterio de aceptación.
3. El método es exacto para una cantidad de 6.02 ppm de carbono, con una media del porcentaje recuperado de 29.46% y un C.V. de 3.23%.
4. La muestra en solución lista para el análisis es estable por un período de 8 horas a temperatura ambiente.
5. El método resultó reproducible. El C.V. total de doce análisis de dos analistas en dos corridas diferentes fue de 7.40%.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE RESULTADOS

En base a los resultados obtenidos de cada una de las técnicas empleadas se puede decir que:

Con la técnica de infrarrojo no fué posible evaluar la limpieza de los equipos utilizados en la fabricación de tabletas de liotironina debido a que los disolventes empleados absorben en infrarrojo, así como alguno de los accesorios.

Posiblemente con accesorios para reflectancia difusa, reflectancia especular o ATR de diamante (reflectancia total atenuada) se podría desarrollar un método adecuado para evaluar la limpieza de los equipos.

Las técnicas de TOC y HPLC desarrolladas permiten evaluar la limpieza de los equipos de fabricación utilizados para tabletas de liotironina y pueden ser utilizados independientemente ya que cada uno por su parte es lineal y cumplen en cada una de las etapas de la validación.

Así mismo los métodos no son comparables linealmente, ya que las pendientes obtenidas son 0.8929 para el método desarrollado por HPLC y 0.3666 para el desarrollado por TOC.

Algunas de las características que se observaron durante el desarrollo del presente trabajo sobre las técnicas de TOC y HPLC para llevar a cabo la evaluación de limpieza de los equipos utilizados en la fabricación de tabletas de liotironina son:

Característica	TOC	HPLC
Especificidad	no	si
Sensibilidad	si	si
Unidades a trabajar	ppm C	ppm de liotironina
Contaminación	susceptible	no susceptible

Característica	TOC	HPLC
Recobros obtenidos	25.55 %	92.15 %
Coefficientes de variación	8.06 %	1.97
Interpretación de respuesta	no necesaria	necesaria
Costos	bajos	altos

Haciendo un balance de lo anterior cabe destacar que lo técnica de HPLC resultó ser una mejor opción para el laboratorio, sacrificando posiblemente los bajos costos que proporciona la técnica de TOC, debido a que el método por cromatografía de líquidos es específica, sensible y cuenta con un C.V. bajo.

Un aspecto muy importante en el desarrollo del presente trabajo experimental fue la observación y relación que se deriva de las características propias no tan solo del activo (liotironina) sino también del medicamento propiamente dicho.

CONCLUSIONES

En el ámbito de validación de limpieza no existe en la actualidad una norma o regulación que establezca la forma de llevarla a cabo, sin embargo como ésta resulta ser de gran importancia, la industria farmacéutica está analizando esta situación y ha tomado diferentes acciones para poder prevenir cualquier contaminación cruzada durante la fabricación de los medicamentos, protegiendo la salud de quien los use.

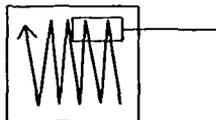
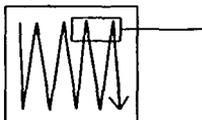
Con base en los resultados obtenidos en este trabajo experimental se concluye que el método que se desarrolló y validó de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución es el más adecuado para verificar la limpieza de los equipos de fabricación empleados para tabletas de liotironina ya que es específico, sensible y cuenta con un C.V. bajo.

Además en este caso particular, la regulación sanitaria al considerar los productos hormonales como de alto riesgo, exige que se verifique la ausencia / presencia del activo, sin tomar en cuenta los niveles permitidos de acuerdo a los criterios de aceptación del peor de los casos.

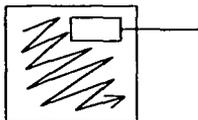
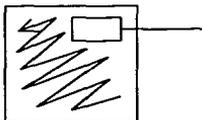
ANEXO I

Toma de muestra por raspado de superficie para validación de limpieza.²²

1. Tomar un hisopo y humedecerlo con la solución a utilizar para la extracción de la muestra empleando una micropipeta.
2. Frotar la placa de acero inoxidable con el hisopo humedecido de la siguiente manera:
 - Primero de arriba hacia abajo y de abajo hacia arriba.



- Girar el hisopo y con la cara contraria con la que raspó en el paso anterior frotar la superficie de la siguiente manera:



Introducir el hisopo en el vial y cortar la punta.

Colocar papel aluminio en la boca del vial y taparlo.

Colocar el papel parafilm sobre la tapa del vial para proteger la muestra.

Extraer la muestra según el método analítico correspondiente.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos 7ª edición, México, 2000, Secretaría de Salud. pp. 973-975.
2. McEvoy, Gerald K.
American Society of Health System Pharmacists (AHFS) Drug Information
2001 pp 3080, 3081.
3. British Pharmacopoeia 2001, Vol I pp 1003.
4. Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Mc-GRAW-Hill Interamericana, 9ª edición, México, pp. 1469-1493.
5. Ganong, William F. Fisiología Médica, El Manual Moderno, 15ª edición, México, 1996, pp. 353-370.
6. PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéutica, 47ª edición, México 2001 pp 546.
7. Métodos Analíticos. Validación. Comité de elaboración de guías oficiales de Validación de la dirección general del control de Insumos para la Salud. SSA. pp 1-3.
8. Harry G. Britain. Validation of Analytical Methodology, *Journal of Validation Technology* 1997, 3 (3), 275-280.
9. PNO A 002 Validación de Métodos Analíticos por Cromatografía de Líquidos y por Cromatografía de Gases. Nysco de México.S.A. de C.V. pp 11.
10. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. UAM-Xochimilco.
11. Michel Thibert , 2001, Curso Avanzado de Cromatografía de Líquidos, Nysco de México S.A. de C.V.
12. USP 24, NF 19, 2000 <621> pp 1914.
13. Skoog, DA, Leary J.J. *Análisis Instrumental*, Mc Graw-Hill, 4ª edición, 1994, pp 296-297.
14. Yuri Castro. Espectrofotometría de Infrarrojo por Transformada de Fourier. Perkin Elmer 19 y 20 de Julio, 2001.
15. Cruz-Garriz, Diana. et.al *Estructura Atómica. Un enfoque químico*. Addison-Wesley Iberoamericana, E.U.A., 1991.
16. Spectrum™ GXF-IR User's Guide Perkin Elmer 1998.
17. ANY-065 Procedimiento Normalizado de Operación. Operación del Espectrofotómetro de Infrarrojo FTIR Perkin Elmer Spectrum GX. Nysco de México S.A. de C.V.
18. Horizontal ATR Accessory FT-IR User's Guide Spectroscopy Perkin Elmer, 1998.

19. Jenkins, K.M., Vanderwielen, A.J., G.P. and Piros, N.A. Application of Total Organic Carbon Analysis to Cleaning Validation. *J.Pharm. Sci & Tech.* , 1996, 50(1), 6-15.
20. Curso impartido por Juan Manuel Salgado. TOC y Validación de procedimientos de limpieza. Colegio Nacional de QFB's.
21. Destin A. LeBlanc. Validated Cleaning Technologies for Pharmaceutical Manufacturing. *Interpharm Press Denver* .2000.
22. Destin A. LeBlanc. Establecimiento de criterios de aceptación científicamente justificados para la validación de limpieza de productos farmacéuticos terminados. *Pharmaceutical Technology*, enero-febrero 1999 pp 33-39.
23. Guía para la Inspección de la Validación de Procesos de Limpieza FDA. Material recopilado por la Asociación Farmacéutica Mexicana.
24. PNO A 049 Cálculo de los Criterios de Aceptación para la Validación de Procedimiento de Limpieza Utilizando Muestreo por Raspado de Superficie. Nysco de México S.A. de C.V.
25. PNO A 050 Desarrollo de Métodos Analíticos por determinación de TOC. Nysco de México S.A. de C.V.
26. Wade Ainley .Weller Paul J, *Handbook of pharmaceutical excipients*. American Pharmaceutical Association, 3ª edición, 2000, pp 215, 522, 534 y 539.
27. ANY-042-3 (PNO) Toma de Muestra por Raspado de Superficie para Validación de Limpieza, Nysco de México S.A. de C.V.